

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA DA SILVA PERES

**ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DAS LESÕES OXIDATIVAS DA GUANINA PELO  
OXIGÊNIO SINGLETE GERADAS NA PRESENÇA DE GLUTATIONA**

CURITIBA

2016

PATRÍCIA DA SILVA PERES

**ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DAS LESÕES OXIDATIVAS DA GUANINA PELO  
OXIGÊNIO SINGLETE GERADAS NA PRESENÇA DE GLUTATIONA**

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção de título de doutor em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Glaucia Regina Martinez.

CURITIBA

2016


## TERMO DE APROVAÇÃO


PATRÍCIA DA SILVA PERES


### ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DAS LESÕES OXIDATIVAS DA GUANINA PELO OXIGÊNIO SINGLETE GERADAS NA PRESENÇA DE GLUTATIONA

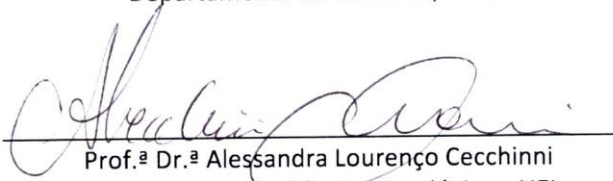
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Glaucia Regina Martinez – Orientadora  
Departamento de Bioquímica, UFPR

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Guilhermina R. Noletto  
Departamento de Bioquímica, UFPR

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sílvia Maria S. C. Cadena  
Departamento de Bioquímica, UFPR

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Morais Leme  
Departamento de Genética, UFPR

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Lourenço Cecchini  
Departamento de Ciências Patológicas, UEL

Curitiba, 24 de fevereiro de 2016.

Aos meus pais,  
Isa e Ildinho.

## **AGRADECIMENTOS**

À pós-graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

À professora Dra. Glaucia Regina Martinez, pela excelente orientação e confiança em meu trabalho.

A todas as professoras do grupo de Oxidações Biológicas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo incentivo e colaboração na análise dos resultados desta tese. Em especial, às professoras Dra. Sílvia Maria Suter Correia Cadena, Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer e Dra. Maria Eliane Merlin Rocha, pela avaliação do projeto e dos relatórios anuais oriundos desta pesquisa.

Ao professor Dr. Paolo Di Mascio, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e à Dra. Alessandra Scalfo, pela síntese de DHPN, composto essencial para o cumprimento desta pesquisa.

À estudante de iniciação científica Andressa Valério, pelo auxílio nos experimentos de síntese de 8-oxodGuo.

A todos os meus colegas de turma e do grupo de Oxidações Biológicas, pelo entendimento que só aqueles em situação parecida podem oferecer. Em especial à Camila, Carina, Carol, Ju, Lucas, Maria Carol, Norminha, Oti, Paloma e Will.

À minha família, em especial meus pais e minhas irmãs, pelo apoio incondicional e pela força quando o caminho parecia pesado demais.

À Capes, CNPq, CT-Infra FINEP e INCT-Redoxoma, pelo auxílio financeiro.

*“Quis mudar tudo.  
Mudei tudo.  
Agora, pós-tudo,  
ex-tudo,  
mudo.”*

*Augusto de Campos*

## RESUMO

A oxidação do nucleosídeo livre 2'-desoxiguanosina (dGuo) e da base guanina (Gua) por oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) tem sido estudada ao longo das três últimas décadas, devido ao papel importante de produtos de oxidação do DNA e dos níveis de glutathione em processos como envelhecimento, mutação e carcinogênese. No presente trabalho investigamos a oxidação da dGuo e da Gua por  $^1\text{O}_2$  na presença do mais importante antioxidante de baixa massa molecular, a glutathione, nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Foram aplicadas diferentes condições de concentração, pH, tempo de incubação, além do uso de um endoperóxido derivado do naftaleno marcado com  $^{18}\text{O}$  como fonte de  $^1\text{O}_2$  marcado (DHPN- $^{18}\text{O}_2$ ). Os dados foram obtidos pela análise dos principais produtos de oxidação da dGuo e da Gua por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e de HPLC acoplado a microTOF Q-II: os diastereoisômeros de espiroiminodihidantoina (dSp) e a 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo). Como resultados interessantes, o aumento de 8-oxodGuo gerada a partir de dGuo oxidada por  $^1\text{O}_2$  na presença de GSH ou GSSG foi confirmado, assim como a diminuição dos níveis de dSp em ambas as condições. A incubação de 8-oxodGuo com DHPNO<sub>2</sub> e GSH ou GSSG, ao invés de dGuo, mostrou que a glutathione protege a oxidação de 8-oxodGuo à dSp. Em DNA, o aumento da geração de 8-oxodGuo só foi observado após adição da menor concentração de GSH ou GSSG. Todos os dados de dGuo, 8-oxodGuo e dSp, juntamente com a quantificação do conteúdo residual de GSH/GSSG em cada amostra sugerem fortemente que a glutathione modifica o mecanismo de oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  por desfavorecer a via de formação de dSp. O aumento dos níveis 8-oxodGuo e a diminuição dos níveis de dSp promovidos pela adição de GSH pode ter consequências biológicas sérias, tais como o aumento da possibilidade da inserção da 8-oxodGuo pela DNA polimerase, o que pode gerar possíveis mutações e assim aumentar o risco de carcinogênese. Além disso, este trabalho também investigou diversas reações de síntese de 8-oxodGuo por reação contendo  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ /ascorbato para encontrar aquela de maior rendimento. As reações encontradas na literatura foram analisadas, testadas e modificadas. A 8-oxodGuo sintetizada foi caracterizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e por HPLC acoplado a microTOF. A reação otimizada foi capaz de sintetizar 8-oxodGuo com um rendimento de 72,0%, um resultado muito melhor que o encontrado nas reações propostas por outros autores. Este método otimizado de síntese de 8-oxodGuo é de grande importância para ensaios que possam requerer a síntese de padrões internos marcados com diferentes isótopos.

Palavras-chave: oxigênio singlete, dGuo, 8-oxodGuo, guanina, GSH, GSSG.

## ABSTRACT

The oxidation of the free nucleoside 2'-deoxyguanosine (dGuo) and of the guanine moiety (Gua) by singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) has been studied over the three last decades due to the major role of DNA oxidation products in process such as ageing, mutation and carcinogenesis. In the present work we investigated the oxidation of dGuo and Gua by  $^1\text{O}_2$  in the presence of the important low molecular antioxidant, glutathione, in its reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms. There were applied different conditions of concentration, pH, time of incubation, and the use of a [ $^{18}\text{O}$ ]-labeled endoperoxide naphthalene derivative as a source of [ $^{18}\text{O}$ ]-labeled  $^1\text{O}_2$ . Data were obtained through analysis of the main products of oxidation of dGuo and Gua by high performance liquid chromatography (HPLC) and HPLC coupled to micrOTOF Q-II: the diastereomers of spiroiminodihydantoin-2'-deoxyribonucleosides (dSp) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo). As interesting results, it was observed that the increase in the 8-oxodGuo generated from the dGuo oxidized by  $^1\text{O}_2$  in the presence of GSH or GSSG was confirmed, as much as the decrease in the dSp levels in the same conditions. The incubation of 8-oxodGuo with DHPNO<sub>2</sub> and GSH or GSSG, rather than dGuo, showed that glutathione protects the oxidation of 8-oxodGuo to dSp. In DNA, the increase in the generation of 8-oxodGuo was observed only after adding the lower concentration of GSH or GSSG. All data from dGuo, 8-oxodGuo and dSp quantification together with the analysis of residual GSH/GSSG content in each sample strongly suggest that glutathione modifies the mechanism of dGuo oxidation by  $^1\text{O}_2$  by disfavoring the pathway of dSp formation. The increased 8-oxodGuo and decreased dSp levels promoted by the addition of GSH can have serious biological consequences, such as increase the possibility of including 8-oxodGuo by the DNA polymerase, which can lead to possible mutations and thus increase the risk of carcinogenesis. Also, the present work investigated different reactions of 8-oxodGuo synthesis using the reactants  $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ /ascorbate in order to find the one with best yield. Reactions found in the literature were analyzed, tested and modified. The synthesized 8-oxodGuo was characterized by high performance liquid chromatography (HPLC) and HPLC coupled to micrOTOF. The optimized reaction was able to synthesize 8-oxodGuo with a 72.0% yield, a result much better than those yields found in others reactions proposed by other authors. This improved method for 8-oxodGuo synthesis is of great importance when employing assays that may require the synthesis of internal standards labeled with stable isotopes.

Keywords: molecular singlet oxygen, dGuo, 8-oxodGuo, guanine, GSH, GSSG.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DE LIBERAÇÃO DO $^x[{}^1\text{O}_2]$ PELA TERMODECOMPOSIÇÃO DO $\text{DHPN}^x\text{O}_2$ .....	21
FIGURA 2 - ESQUEMA DAS REAÇÕES DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO DOS TIPOS I E II .....	22
FIGURA 3 - MECANISMO DE OXIDAÇÃO DA dGUO POR ${}^1\text{O}_2$ EM SOLUÇÃO AQUOSA .....	26
FIGURA 4 - FORMAÇÃO DE FAPY-dGUO E DE 8-OXOdGUO PELO ${}^\bullet\text{OH}$ .....	29
FIGURA 5 - ESQUEMA DA OXIDAÇÃO DA 8-OXOGUA POR ${}^1\text{O}_2$ EM DNA DE FITA SIMPLES .....	32
FIGURA 6 - COMPARAÇÃO DOS MECANISMOS DE OXIDAÇÃO DA GUANINA POR ${}^1\text{O}_2$ EM NUCLEOSÍDEOS E EM DNA .....	33
FIGURA 7 - TRANSVERSÃO DE GUANINA PARA TIMINA ORIGINADA A PARTIR DA FORMAÇÃO DE 8-OXOdGUO .....	34
FIGURA 8 - ESTRUTURA DA GLUTATIONA .....	35
FIGURA 9 - CICLO CATALÍTICO DA GLUTATIONA .....	37
FIGURA 10 - EFEITO DA ADIÇÃO DE GSH E DE GSSG NA OXIDAÇÃO DA dGUO POR ${}^1\text{O}_2$ .....	40
FIGURA 11: PORCENTAGEM DE 8-OXOdGUO E $[{}^{18}\text{O}]$ 8-OXOdGUO APÓS ADIÇÃO DE GSH OU GSSG. ....	50
FIGURA 12 - CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE dGUO E DE 8-OXOdGUO NA CONDIÇÃO DE SEPARAÇÃO II.....	53
FIGURA 13 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA 8-OXOdGUO EM 254 nm..	54
FIGURA 14 - DETECÇÃO DE 8-OXOdGUO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	54
FIGURA 15 - REAÇÃO VII REALIZADA EM DIFERENTES TEMPOS E SUA COMPARAÇÃO COM AS REAÇÕES PADRÃO I E II .....	55
FIGURA 16 - CINÉTICA DA REAÇÃO II E SUA COMPARAÇÃO COM A REAÇÃO VIII A 37°C.....	56
FIGURA 17 - ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO II A 37°C E A 45°C .....	57
FIGURA 18 - COMPARAÇÃO ENTRE AS REAÇÕES VIII, IX E X .....	58

FIGURA 19 - EFEITO DA GSH E DA GSSG NA OXIDAÇÃO DA 8-OXOdGUO POR $^1\text{O}_2$ .....	59
FIGURA 20 - CONCENTRAÇÃO DE GSH E DE GSSG EM SOLUÇÕES CONTENDO dGUO, DHPNO <sub>2</sub> E GSH OU GSSG.....	62
FIGURA 21 - CONCENTRAÇÃO DE GSH E DE GSSG EM SOLUÇÕES CONTENDO 8-OXOdGUO, DHPNO <sub>2</sub> E GSH OU GSSG.....	63
FIGURA 22 - EFEITO DA GSH OU GSSG NA OXIDAÇÃO DA dGUO EM pD 9,0. ....	65
FIGURA 23 - CONCENTRAÇÃO DE GSH E DE GSSG EM SOLUÇÕES CONTENDO dGUO, DHPNO <sub>2</sub> E GSH OU GSSG EM pD 9,0.....	67
FIGURA 24 - CONCENTRAÇÃO DE FFA APÓS FOTOSSENSIBILIZAÇÃO COM ROSA BENGALA.....	69
FIGURA 25 - CONSUMO DE FFA NAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM ROSA BENGALA 10 E 20 $\mu\text{MOL/L}$ .....	70
FIGURA 26 - LINEARIZAÇÃO DOS DADOS DA IRRADIAÇÃO DE ROSA BENGALA 20 $\mu\text{mol/L}$ .....	71
FIGURA 27 - EFEITO DA GSH E DA GSSG NA OXIDAÇÃO DE DNA POR $^1\text{O}_2$ .....	72
FIGURA 28 - CONCENTRAÇÃO DE GSH E DE GSSG EM SOLUÇÕES CONTENDO DNA DE TIMO DE BEZERRO E GSH 1 OU 5 mmol/L .....	74
FIGURA 29 - CONCENTRAÇÃO DE GSH E DE GSSG EM SOLUÇÕES CONTENDO DNA DE TIMO DE BEZERRO E GSSG 1 OU 5 mmol/L .....	75
FIGURA 30 - EFEITO DA GLUTATIONA NA OXIDAÇÃO DA dGUO POR $^1\text{O}_2$ .....	86

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA NOS ORBITAIS MOLECULARES ( $\Pi^*$ ) DO OXIGÊNIO NO ESTADO EXCITADO SINGLETE ( $^1\Sigma_g^+$ E $^1\Delta_g$ ) E NO ESTADO FUNDAMENTAL TRIPLETE ( $^3\Sigma_g^-$ ) .....	19
TABELA 2 - TAXA DE DESATIVAÇÃO TOTAL DO $^1O_2$ PELOS DERIVADOS DE NUCLEOSÍDEOS .....	24
TABELA 3 - DESCRIÇÃO DAS DIFERENTES REAÇÕES DE SÍNTESE DE 8-OXOdGUO .....	43
TABELA 4 – REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DA dGUO.....	52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$  - oxigênio singlete

$^{18}[^1\text{O}_2]$  - oxigênio singlete isotopicamente marcado

8-oxoGua - 8-oxo-7,8-dihidroguanina

8-oxodGuo - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

$[^{18}\text{O}]$  8-oxodGuo - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina isotopicamente marcada

$\gamma$ -GCS -  $\gamma$ -glutamil cisteinil sintetase

$\gamma$ -GT -  $\gamma$ -glutamiltanspeptidase

ACN - acetonitrila

cGMP - guanosina monofosfato cíclica

Cys-S<sup>-</sup> - íon tiolato-cisteína

dGuo - 2'-desoxiguanosina

DETAPAC - ácido dietilenotriaminopentacético

DHPN - *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida

DHPNO<sub>2</sub> - endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida

DHPN<sup>18</sup>O<sub>2</sub> - endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida isotopicamente marcado com <sup>18</sup>O

dlz - diastereoisômeros de 2-amino-5-[(2-deoxi-β-D-eritropentofuranosil) amino]-4*H*-imidazolona-4

DNA - ácido desoxirribonucléico

dOz - diastereoisômeros de 2,2-diamino-4-[2-deoxi-β-D-eritropentofuranosil amino]-5-(2*H*)-oxazolona

dSp - diastereoisômeros espiroiminodihidantoína desoxirribose

EC - eletroquímico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

endo III - endonuclease III

FFA - álcool furfurílico

FPG - formamidopirimidina glicosilase

Gh<sup>ox</sup> - guanidinodantoína oxidada

GPx ou GSH-Px - glutationala peroxidase

GR - glutationa redutase

GS - glutationa sintetase

GSH - glutationa

GSSG - glutationa dissulfeto

GSTs - glutationa-S-transferases

HPLC - cromatografia líquida de alta *performance*

HPLC-ESI/MS/MS - espectrometria de massa *eletrospray* em tandem

MeOH - metanol

microTOF Q-II - espectrômetro de massas do tipo híbrido quadrupolo/tempo de voo

Mn-TMPyP - porfirina diaqua-meso-tetrakis(4-N-metilpiridiniumil) de manganês

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NDPO<sub>2</sub> - endoperóxido de 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio

Oxa - ácido oxalúrico

PhGPx - lipoperóxido glutationa peroxidase

pK<sub>a</sub> - constante de dissociação do ácido

RNHCl - N-cloroaminas

ROS - espécies reativas de oxigênio

ROOH - peróxidos orgânicos

RSCl - cloretos de sulfenila

RSNO - proteínas S-nitrosotióis

RSNOH• - radical tionitróxido

RSOH - ácido sulfênico

RSO<sub>2</sub>H - ácido sulfínico

RSO<sub>3</sub>H - ácido sulfônico

T4-endo V - T4 dímero de pirimidina glicosilase endonuclease V

UV - ultravioleta

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	19
3.1 O OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE .....	19
3.2 LESÕES OXIDATIVAS NO DNA.....	23
3.2.1 OXIDAÇÃO DA dGUO POR OXIGÊNIO SINGLETE .....	24
3.2.2 OXIDAÇÃO DA dGUO POR REAGENTES DE FENTON (Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) OU POR Cu <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /ASCORBATO.....	27
3.2.3 OXIDAÇÃO DO DNA POR OXIGÊNIO SINGLETE .....	29
3.3 GLUTATIONA.....	35
3.4 GLUTATIONA, OXIGÊNIO SINGLETE E LESÕES AO DNA .....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Síntese de DHPNO <sub>2</sub> .....	41
4.2 Síntese de dSp .....	41
4.3 Síntese de 8-oxodGuo.....	42
4.3.1 Oxidação da dGuo por Fe <sup>2+</sup> ou Cu <sup>2+</sup> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /ascorbato .....	42
4.3.2 Pré-purificação da 8-oxodGuo .....	43
4.3.3 Detecção e quantificação da dGuo e da 8-oxodGuo.....	44
4.5 Detecção de dGuo e de seus produtos de oxidação .....	45
4.6 Quantificação do conteúdo residual de GSH/GSSG em solução .....	46
4.8 Irradiação de DNA de timo de bezerro com rosa bengala .....	47
4.9 Hidrólise de DNA de timo de bezerro .....	47
4.10 Precipitação de DNA de timo de bezerro.....	48
4.11 Análise estatística.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1 Aumento da geração de 8-oxodGuo na oxidação da dGuo por <sup>18</sup> [ <sup>1</sup> O <sub>2</sub> ] na presença de GSH ou GSSG.....	49
5.2 Síntese de 8-oxodGuo.....	51
5.3 Efeito da GSH ou da GSSG nos produtos da oxidação da 8-oxodGuo por <sup>1</sup> O <sub>2</sub> em D <sub>2</sub> O .....	59

5.4 Avaliação do conteúdo residual de GSH e GSSG nas amostras após incubação em D <sub>2</sub> O .....	60
5.5 Avaliação da adição de GSH e GSSG na oxidação da dGuo por <sup>1</sup> O <sub>2</sub> em D <sub>2</sub> O modificada para pD 9,0.....	64
5.6 Avaliação do conteúdo residual de GSH e GSSG nas amostras após incubação em D <sub>2</sub> O modificada para pD 9,0 .....	66
5.7 Geração de <sup>1</sup> O <sub>2</sub> 3 mmol/L por fotossensibilização do rosa bengala .....	68
5.8 Efeito da GSH e da GSSG na oxidação de DNA de timo de bezerro em D <sub>2</sub> O.....	71
5.9 Avaliação do conteúdo residual de GSH e GSSG nas amostras de DNA de timo de bezerro incubadas em D <sub>2</sub> O.....	73
6. DISCUSSÃO .....	76
7. CONCLUSÕES .....	85
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS .....	98

## 1. INTRODUÇÃO

O oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é a forma mais reativa do oxigênio molecular e pode ser gerado por diversos processos em sistemas biológicos. Ele é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) do tipo não radicalar e possui alta capacidade de reagir com diversas biomoléculas por oxidação. Sua geração em laboratório pode ser realizada por diversos processos, dentre deles fotossensibilização do tipo II (FOOTE, 1991), reação entre peróxido de hidrogênio e hipoclorito (HELD *et al.*, 1978) ou peroxinitrito (DI MASCIO *et al.*, 1994) e também por termodecomposição de endoperóxidos derivados do naftaleno (PIERLOT *et al.*, 2000), como o *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPN).

Dentre as biomoléculas, o DNA merece especial atenção devido ao seu papel crucial na hereditariedade. Embora outras ROS possam reagir de diferentes formas com as quatro bases do DNA, o  $^1\text{O}_2$  interage especificamente com a base púrica guanina (RAVANAT *et al.*, 2000). Isto ocorre em virtude do seu menor potencial de redução e também da energia de seu orbital molecular. O mecanismo de oxidação do nucleosídeo livre 2'-desoxiguanosina (dGuo) por  $^1\text{O}_2$  foi intensivamente estudado nos últimos trinta anos e foi mostrado que os produtos principais são os diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína (dSp) (NILES *et al.*, 2001) e a 8-oxo-7,8-dihidrodessoxiguanosina (8-oxodGuo) (SHEU; FOOTE, 1993). Dentre estes, o produto majoritário é a dSp. A 8-oxodGuo pode sofrer uma reoxidação por outra molécula de  $^1\text{O}_2$  e gerar um 5-hidroperóxido capaz de formar dSp, imidazolona (dlz), ou guanidinodantoína oxidada (dGhox) (MARTINEZ *et al.*, 2002). A dlz se transforma em oxazolona (dOz) por hidrólise. No caso da oxidação do DNA dupla fita por  $^1\text{O}_2$ , não há formação de dSp e a dGhox gerada pela oxidação da 8-oxodGuo é precursora de ácido oxalúrico (DUARTE *et al.*, 2000a).

A glutathiona reduzida (GSH) é um tiol de baixa massa molecular de reconhecida capacidade antioxidante (HAYES; PULFORD, 1995). Ela age principalmente como co-fator para a redução de peróxidos com sua oxidação para sua forma dissulfeto, a GSSG (CNUBBEN *et al.*, 2001). Com o intuito de preservar os níveis intracelulares de GSH, a glutathiona redutase catalisa a reação oposta de



geração de GSH a partir de GSSG, às custas do poder redutor do NADPH (HUBER *et al.*, 2008).

A relação entre glutathione e  $^1\text{O}_2$  é bastante controversa. Já foi mostrado que a GSH, por si só, poderia gerar  $^1\text{O}_2$  quando em contato com o radical ânion superóxido (WEFERS; SIES, 1983). Diversos tióis, entre estes a GSH, foram reportados como *quenchers* de  $^1\text{O}_2$  e esta propriedade aumentava com o aumento do pH (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991c). Outro estudo testou o efeito de tióis, incluindo a GSH, na oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  gerado por decomposição térmica do endoperóxido de 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio (NDPO<sub>2</sub>). Neste caso, foi mostrado que alguns tióis aumentaram os níveis de 8-oxodGuo formados pelo  $^1\text{O}_2$  gerado por NDPO<sub>2</sub> 40 mmol/L (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991b). Contudo, nenhuma tentativa de detecção e quantificação de dSp ou do conteúdo residual de tiol foi realizada nestes estudos.

O que parece estar de certa forma esclarecido até o momento é que são distintos os mecanismos por meio dos quais GSH e  $^1\text{O}_2$  atuam em conjunto no DNA e geram produtos de oxidação. Inclusive, os próprios caminhos de oxidação por  $^1\text{O}_2$  são diferentes para DNA e para nucleosídeos livres (MARTINEZ *et al.*, 2002), de modo que a adição de GSH deve agir de forma diferenciada nestes dois casos.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O estudo da oxidação do nucleosídeo livre dGuo por  $^1\text{O}_2$  e da adição de glutathiona na formação destes produtos em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) já foi iniciado por este grupo, encontrando uma inversão no produto majoritário da reação na presença do tiol, ou seja, mais 8-oxodGuo e menos dSp. Esta tese fornece dados que colaboram na elucidação dos mecanismos por meio dos quais a interação entre o  $^1\text{O}_2$  e a glutathiona, nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), afetam a formação de produtos de oxidação do nucleosídeo livre 2'-desoxiguanosina (dGuo) ou do ácido desoxirribonucleico (DNA), cujo papel é crucial na replicação celular. A elucidação desse processo contribui para a compreensão de fenômenos que ocorrem em organismos vivos em virtude da geração de  $^1\text{O}_2$  nas proximidades do núcleo celular e para o entendimento da formação de dano oxidativo ao DNA na presença de GSH.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal investigar como a GSH e a GSSG alteram os produtos de oxidação do nucleosídeo livre dGuo por  $^1\text{O}_2$  gerado a partir do endoperoxídeo DHPNO<sub>2</sub> e os produtos de oxidação do DNA por  $^1\text{O}_2$  gerado a partir de fotossensibilização do tipo II com rosa bengala .

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Quantificação da formação dos produtos de oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  gerado a partir do DHPNO<sub>2</sub> - 8-oxodGuo e dSp - em função de diferentes tempos de incubação e em pD superior ao pKa da cisteína, além da verificação dos efeitos da adição de GSH ou GSSG ao sistema.
- ii) Desenvolvimento de uma metodologia para a síntese de 8-oxodGuo de alto rendimento.

- iii) Quantificação da formação do produto de oxidação da 8-oxodGuo por  $^1\text{O}_2$  gerado a partir do DHPNO<sub>2</sub> - dSp – e dos efeitos que a adição de GSH ou GSSG possa causar ao sistema.
- iv) Quantificação da formação do produto de oxidação de DNA por  $^1\text{O}_2$  gerado a partir de fotossensibilização do tipo II do rosa bengala – 8-oxodGuo – e dos efeitos que a adição de GSH ou GSSG possa causar ao sistema.
- v) Quantificação do conteúdo residual de GSH e de GSSG nas incubações relatadas acima.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE

O oxigênio molecular, no estado fundamental, possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais  $\pi$  de mesma energia, caracterizando um estado tripleto ( $^3\Sigma_g^-$ ). Neste estado, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do spin. Porém, com acréscimo de energia pode ser gerada uma forma mais reativa do oxigênio, o oxigênio molecular singleto ( $^1O_2$ ), o qual não possui restrição por spin. O  $^1O_2$  pode se apresentar em dois estados excitados,  $^1\Delta_g$  e  $^1\Sigma_g^+$ , conforme pode ser observado na TABELA 1. O primeiro apresenta dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital e possui uma energia de 22,5 kcal acima do estado fundamental. O segundo tem um elétron em cada orbital  $\pi$  degenerado, com spins opostos, e possui uma energia de 37,5 kcal acima do estado fundamental. O estado  $^1\Sigma_g^+$  tem um tempo de vida muito curto em meio aquoso ( $10^{-11}$  s), sendo rapidamente desativado para o estado  $^1\Delta_g$ , o qual é na verdade a espécie denominada por  $^1O_2$  (RONSEIN *et al.*, 2006).

**TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA NOS ORBITAIS MOLECULARES ( $\pi^*$ ) DO OXIGÊNIO NO ESTADO EXCITADO SINGLETE ( $^1\Sigma_g^+$  E  $^1\Delta_g$ ) E NO ESTADO FUNDAMENTAL TRIPLETE ( $^3\Sigma_g^-$ )**

Estado	Orbitais $\pi^*$	Energia (kcal/mol)	Tempo de vida (s)
$^1\Sigma_g^+$	$\uparrow \downarrow$	37,5	$10^{-11}$
$^1\Delta_g$	$\uparrow \downarrow$	22,5	$10^{-6}$
$^3\Sigma_g^-$	$\uparrow \uparrow$		

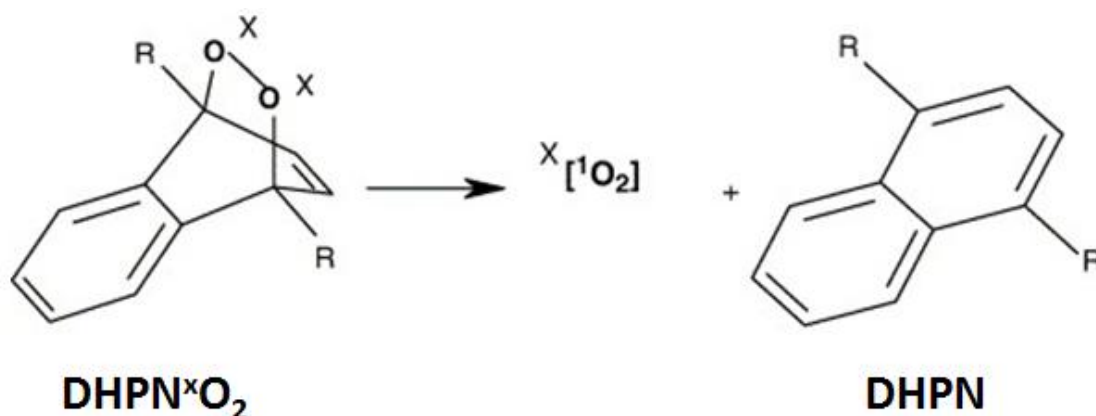
FONTE: Adaptado de *Quim.Nova* **2006**, 29, 563, com permissão da Sociedade Brasileira de Química.  
 NOTA: Observa-se que, no estado fundamental ou tripleto, o oxigênio molecular apresenta dois elétrons desemparelhados, com *spins* paralelos. Já no estado singleto, não existem elétrons desemparelhados

Inclusive, a energia de decaimento do  $^1O_2$  ao estado fundamental é transmitida para o solvente em forma de vibração. Assim, seu tempo de vida depende do meio no qual ele é gerado. Em soluções aquosas, por exemplo, o  $^1O_2$

tem vida muito curta, cerca de 3,8  $\mu\text{s}$ , pois o grupo hidroxila possui uma alta energia de vibração ( $\sim 3600 \text{ cm}^{-1}$ ), a qual contribui para um decaimento mais rápido para o estado tripleto. A substituição do isótopo  $^1\text{H}$  da água pelo isótopo  $^2\text{H}$ , transformando a água em sua forma deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), diminui sobremaneira esta frequência de vibração, o que resulta em um aumento de cerca de 20 vezes no tempo de vida do  $^1\text{O}_2$ , o qual passa a ser de aproximadamente 62  $\mu\text{s}$  (WALLING *et al.*, 1995). Esta característica é frequentemente utilizada como estratégia para aumentar tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  em solução aquosa.

A geração de  $^1\text{O}_2$  pode ocorrer a partir de diversos processos, sejam eles de origem química, física ou biológica. Quimicamente, o  $^1\text{O}_2$  pode ser formado por diversas reações, tais como pela decomposição de hidroperóxidos de lipídeos em radicais peroxil (MIYAMOTO *et al.*, 2007), pelas reações de peróxido de hidrogênio com hipoclorito (HELD *et al.*, 1978) ou com peroxinitrito (DI MASCIO *et al.*, 1994), e também pela decomposição térmica de endoperóxidos derivados do naftaleno (PIERLOT *et al.*, 2000). Dentre estes derivados, encontra-se o endoperóxido de *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida ( $\text{DHPNO}_2$ ), o qual é decomposto a  $^1\text{O}_2$  e a seu precursor *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPN) com rendimento de 60% após incubação a 37°C por 2,5 horas (PIERLOT *et al.*, 2000; ALVES DE ALMEIDA *et al.*, 2007). O  $\text{DHPNO}_2$  pode ainda ser sintetizado com o isótopo  $^{18}\text{O}$  no lugar do  $^{16}\text{O}$  ( $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ ), o qual libera oxigênio singlete igualmente marcado ( $^{18}[^1\text{O}_2]$ ), como pode ser observado na FIGURA 1. Esta estratégia é de interesse particular em situações nas quais se deseja estudar os produtos de oxidação do  $^1\text{O}_2$ , pois os mesmos teriam ao menos um átomo marcado, o qual seria facilmente detectado por HPLC acoplado a espectrometria de massas (MARTINEZ *et al.*, 2004).

FIGURA 1 - ESQUEMA DE LIBERAÇÃO DO  $^x[{}^1\text{O}_2]$  PELA TERMODECOMPOSIÇÃO DO  $\text{DHPN}^x\text{O}_2$

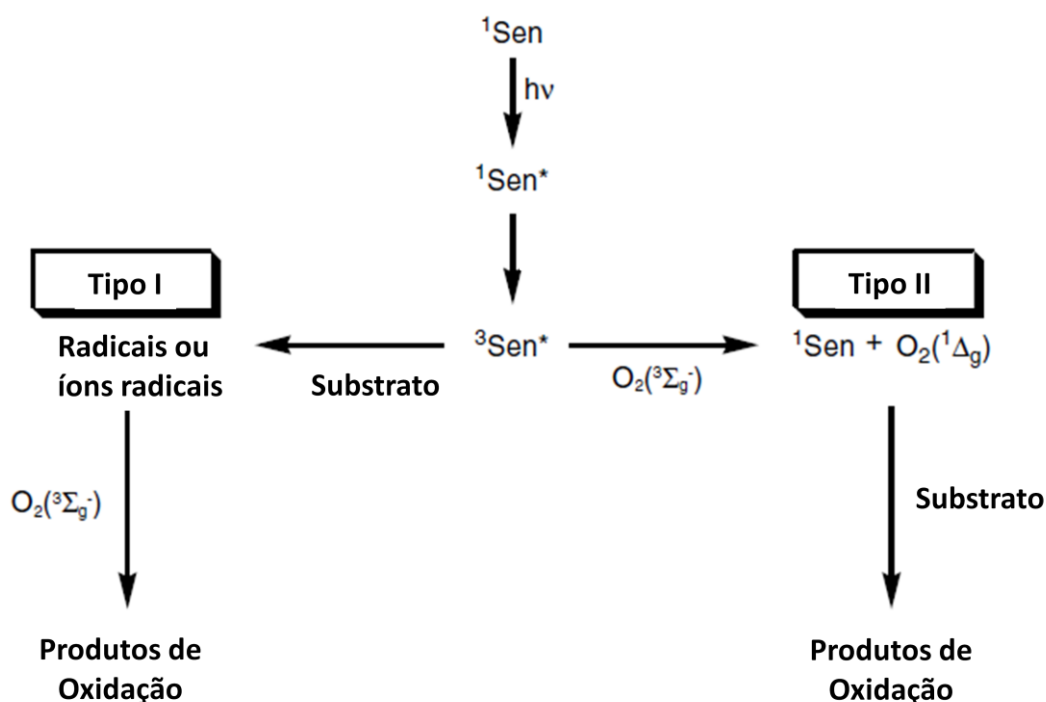


FONTE: Modificada de Alves de Almeida *et al.* (2007) com a permissão de Elsevier Copyright © 2007. NOTA: Após reação de termod decomposição completa, o  $\text{DHPN}^x\text{O}_2$  libera  $^x[{}^1\text{O}_2]$  e seu precursor DHPN. O X pode representar o  $^{16}\text{O}$  ou  $^{18}\text{O}$ .

Fisicamente, sabe-se que a radiação ultravioleta A (UVA) pode levar à formação de  ${}^1\text{O}_2$  (KLOTZ *et al.*, 2001). O  ${}^1\text{O}_2$  também pode ser gerado a partir de uma reação de fotossensibilização do tipo II. Tal reação ocorre quando a luz é absorvida por um fotossensibilizador (corantes como o azul de metileno ou o rosa bengala), originando primeiramente um estado excitado, o qual reage como oxigênio molecular e, por transferência de energia, forma  ${}^1\text{O}_2$ . Na reação do tipo I, o fotossensibilizador no estado excitado reage com um solvente ou com outro substrato orgânico, e não com o oxigênio, e por isso não há formação de  ${}^1\text{O}_2$  (FOOTE, 1991; SIKORSKA *et al.*, 2005). As duas reações estão esquematizadas na FIGURA 2.

Biologicamente, a geração de  ${}^1\text{O}_2$  pode ocorrer no *burst* respiratório resultante da fagocitose, na biossíntese de prostaglandinas e em algumas atividades enzimáticas, como das lipoxigenases e das dioxigenases (KANOFISKY, 1989; STEINBECK *et al.*, 1992). Como consequências biológicas de sua formação, o  ${}^1\text{O}_2$  pode oxidar lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, podendo estar envolvido na gênese ou no desenvolvimento de diversas patologias, tais como porfiria e câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

FIGURA 2 - ESQUEMA DAS REAÇÕES DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO DOS TIPOS I E II



FONTE: Adaptada de Sikorska *et al.* (2005) com a permissão de Elsevier Copyright © 2005.

NOTA: No mecanismo de tipo I, o fotossensibilizador excitado ( $\text{Sen}^*$ ) reage diretamente com o substrato por doação ou aceitação de elétrons, o que por consequência produz radicais ou íons radicais. Estes podem sofrer reações secundárias com biomoléculas, gerando produtos de oxidação. No mecanismo de tipo II, o fotossensibilizador excitado ( $\text{Sen}^*$ ) reage diretamente doando energia ao oxigênio triplete, gerando oxigênio singleto. A reação do oxigênio singleto com diversos substratos pode gerar produtos oxidados.

LEGENDA: Sen: fotossensibilizador;  $^1\text{Sen}^*$ : fotossensibilizador excitado no estado singleto;  $^3\text{Sen}^*$ : fotossensibilizador excitado no estado triplete.

O  $^1\text{O}_2$  é considerado uma espécie reativa de oxigênio (ROS) do tipo não radicalar e, como tal, é capaz de oxidar e danificar diversas biomoléculas (OGILBY, 2010). Sua interação com estas biomoléculas pode ocorrer por meio de reações químicas ou por supressão física. No último caso, o  $^1\text{O}_2$  transfere sua energia de excitação e retorna ao estado fundamental (RONSEIN *et al.*, 2006). Já no caso de reações químicas, as mais comuns são a adição a dienos conjugados (cicloadição do tipo Diels-Alder, 2 + 4), geralmente resultando na formação de endoperóxidos (BLOODWORTH; EGGELTE, 1984) e a adição 1,3 a uma dupla ligação, formando “ene” hidroperóxidos (FOOTE; DENNY, 1971). O  $^1\text{O}_2$  pode ainda reagir com compostos fenólicos para formar hidroperoxidienonas (FOOTE *et al.*, 1976) e com sulfetos, formando sulfóxidos (AKASAKA *et al.*, 1988).

Foi também demonstrado que há formação de peróxido de tirosina quando peptídeos e proteínas são expostos ao  $^1\text{O}_2$  (WRIGHT *et al.*, 2002). Outros aminoácidos, como a cisteína, metionina, triptofano e histidina também podem formar peróxidos após oxidação pelo  $^1\text{O}_2$ . Estes peróxidos possuem tempo de vida longo, com meia-vida de aproximadamente 30 min (WRIGHT *et al.*, 2003). O  $^1\text{O}_2$  pode ainda interagir com o material genético, gerando lesões ao DNA. Estas, se não reparadas, podem gerar mutações que, se localizadas em genes específicos, podem predispor a formação de neoplasias.

### 3.2 LESÕES OXIDATIVAS NO DNA

O DNA é susceptível a lesões por diferentes tipos de ROS, incluindo o radical hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) e o  $^1\text{O}_2$  (CADET; TEOULE, 1978). O mecanismo pelo qual o DNA vai ser lesionado depende do tipo de ROS envolvido na reação. O  $^{\bullet}\text{OH}$  é a ROS mais reativa e pode gerar uma diversidade de lesões em todas as bases e no açúcar. Por outro lado, o  $^1\text{O}_2$  é mais seletivo, reagindo especificamente com a guanina. Por conta dos diferentes mecanismos de formação das lesões pelas diferentes classes de ROS, a identificação dos tipos de dano encontrados no DNA fornece informações sobre a possível espécie envolvida na geração da lesão.

O dano ao DNA por ROS pode ocorrer de diversas formas, como por oxidação de bases, formação de sítios abásicos (apurínicos ou apirimidínicos), quebras de fita, *cross-links* inter e intrafita, ou *cross-links* entre DNA e proteínas (JENA; MISHRA, 2011; RAVANAT *et al.*, 2012). Entre todos esses processos, a oxidação de bases é o mais comum (JENA; MISHRA, 2011). As ROS também podem produzir anéis saturados de timina, hidroximetiluracila, fragmentos de timina e abertura do anel de adeninas (IMLAY e LINN, 1998).



### 3.2.1 OXIDAÇÃO DA dGUO POR OXIGÊNIO SINGLETE

O  $^1\text{O}_2$  é reativo frente às bases do DNA, mas não frente à pentose. Dentre todas as bases púricas e pirimídicas, a guanina é o principal alvo de oxidação de  $^1\text{O}_2$ , pois a energia de seu orbital molecular é a única que permite tal reação (CADET; TEOULE, 1978; CADET *et al.*, 1997; RAVANAT *et al.*, 2000). A taxa de desativação total do  $^1\text{O}_2$  (*quenching* químico e físico) de nucleosídeos da guanina é bastante superior à taxa dos outros nucleosídeos (PRAT *et al.*, 1997). Neste último estudo, foram usados derivados lipofílicos da guanosina, adenosina e citidina e timidina, dissolvidos em solvente não aquoso, o 1,1,2-triclorotrifluoroetano, no qual o tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  é de aproximadamente 18 ms. Observou-se que a guanosina tem poder de *quencher* de  $^1\text{O}_2$  muito maior do que os demais nucleosídeos, numa razão G:A:C:T de 100:2:0,6:0,2 como pode ser observado na TABELA 2.

**TABELA 2 - TAXA DE DESATIVAÇÃO TOTAL DO  $^1\text{O}_2$  PELOS DERIVADOS DE NUCLEOSÍDEOS**

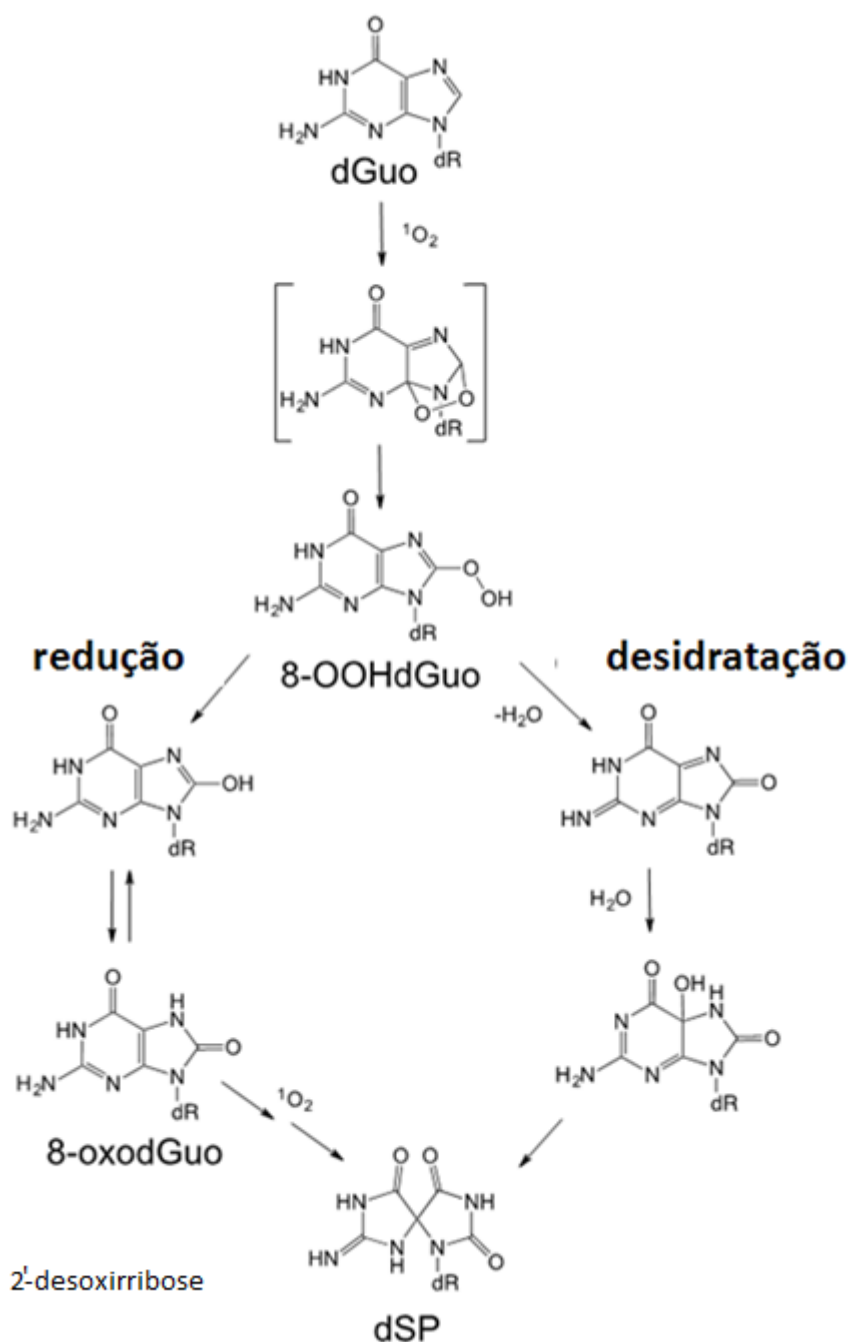
Substrato	Nucleosídeo de origem	Taxa de desativação ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
2',3',5'-tris(( <i>tert</i> -butildimetilsilil)oxi)guanosina	Guanosina	$(3 \pm 0,2) \times 10^6$
2',3',5'-tris(( <i>tert</i> -butildimetilsilil)oxi)adenosina	Adenosina	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^4$
2',3',5'-tris(( <i>tert</i> -butildimetilsilil)oxi)citidina	Citidina	$(5,8 \pm 0,1) \times 10^4$
3',5'-bis(( <i>tert</i> -butildimetilsilil)oxi)timidina	Timidina	$(6,9 \pm 0,3) \times 10^3$

FONTE: Adaptada com permissão de Prat *et al.* (1997) Copyright © 1997 American Chemical Society.

O produto mais abundante da reação entre o  $^1\text{O}_2$  e o nucleosídeo livre de guanina - 2'-desoxiguanosina ou dGuo - é o par de diastereoisômeros de espiroiminodihidantoína (dSp), conforme relatado anteriormente (NILES *et al.*, 2001). Ainda não há comprovação científica de que, quando formados no *pool* de nucleotídeos, tais diastereoisômeros possam ser substratos para DNA polimerases. Porém, estudos *in vitro* com as polimerases  $\alpha$  e  $\beta$  sugeriram que a presença dos diastereoisômeros dSp na fita molde pode bloquear a extensão da replicação além dessas lesões (DUARTE *et al.*, 1999; JIA *et al.*, 2005). Também há evidência de que tenham conformação semelhante à timina e pareiem com adenina ou que possam gerar transversões do tipo G  $\rightarrow$  C, ou seja, de guanina para citosina (DAVID *et al.*, 2007; BURROWS, 2009).

Em menor extensão, a oxidação da dGuo em solução aquosa também gera o produto 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), lesão que é extremamente importante, pois quando gerada no *pool* de nucleotídeos, a 8-oxodGuo pode ser inserida na nova fita pela DNA polimerase  $\eta$  (SHIMIZU *et al.*, 2007; SUZUKI *et al.*, 2007). Quando gerada no DNA, ela possui um alto potencial mutagênico, uma vez que é capaz de parear com adenina e gerar uma transversão  $G \rightarrow T$ , ou seja, de guanina para timina (BOITEUX *et al.*, 1992).

O mecanismo completo da oxidação da dGuo por  $^1O_2$  tem sido intensivamente estudado nos últimos trinta anos (BOITEUX *et al.*, 1992; SHEU; FOOTE, 1993; RAVANAT *et al.*, 2000; NILES *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2002; HENDERSON *et al.*, 2003; RAVANAT *et al.*, 2005; CADET; WAGNER, 2013) e parte do conhecimento atual sobre este processo pode ser sumarizado pela FIGURA 3. Como mostrado, a oxidação da dGuo por  $^1O_2$  segue duas vias principais originadas de um intermediário comum: uma que leva à formação direta de dSp, e outra que gera 8-oxodGuo. Primeiramente, dois diastereoisômeros 4,8-endoperóxidos são formados por meio de uma cicloadição do tipo Diels-Alder [2+4] nas posições C4 e C8 da dGuo. Este intermediário instável pode gerar o 8-hidroperóxido da 2'-desoxiguanosina (8-OOHdGuo), a qual pode sofrer redução por um agente ainda desconhecido e formar 8-oxodGuo. Uma segunda possibilidade seria que este intermediário fosse desidratado e depois reidratado, em um processo que dá origem à dSp. Além disso, a 8-oxodGuo recém formada pode sofrer uma nova oxidação por uma segunda molécula de  $^1O_2$  e então gerar um intermediário 5-hidroperóxido, o qual é capaz de formar dSp mediante rearranjo ou então dar origem aos diastereoisômeros de 2-amino-5-[(2-desoxi- $\beta$ -D-eritro-pentafuranosil)-amino]-4H-imidazol-4-ona (dlz) e seu produto estável 2,2-diamino-4-[-(2-desoxi- $\beta$ -D-eritropentafuranosil)amina]-5-(2H)-oxazolona (dOz) (MARTINEZ *et al.*, 2002).

FIGURA 3 - MECANISMO DE OXIDAÇÃO DA dGUO POR  $^1\text{O}_2$  EM SOLUÇÃO AQUOSA

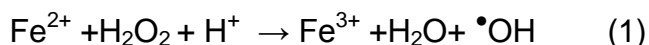
FONTE: Modificada de Peres *et al.* (2015) com a permissão de Elsevier Copyright © 2015.

NOTA: A dGuo pode ser oxidada por uma molécula  $^1\text{O}_2$  a 8-OOHdGuo, a qual pode gerar 8-oxodGuo por redução ou pode gerar dSp por um processo de desidratação seguido de reidratação. A 8-oxodGuo recém formada pode ser oxidada por uma segunda molécula de  $^1\text{O}_2$  e originar mais dSp.

A natureza dos produtos de oxidação da 8-oxodGuo por  $^1\text{O}_2$  é altamente dependente do ambiente químico. Apenas o ácido oxalúrico é observado quando a purina oxidada está em oligonucleotídeos, enquanto dOz e dSp – e não ácido oxalúrico – são os produtos principais da oxidação do nucleosídeo livre 8-oxodGuo. As razões para estas diferenças ainda precisam ser esclarecidas (AGNEZ-LIMA *et al.*, 2012). Além do  $^1\text{O}_2$ , outras ROS podem também gerar as lesões dSp e dlz. Como exemplo, a oxidação da dGuo e da 8-oxodGuo por óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) gera dSp (SUZUKI, 2009) e a conversão de dGuo em dlz pode ocorrer através de uma variedade de oxidantes incluindo o radical hidroxil ( $^\bullet\text{OH}$ ), o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\bullet$ ) e o par porfirina de manganês/peroximonosulfato de potássio ( $\text{MnTMPyP/KHSO}_5$ ), destacando que há múltiplas (e independentes) vias que levam à formação de intermediários comuns que convergem para os mesmos produtos finais (NILES *et al.*, 2006).

### 3.2.2 OXIDAÇÃO DA dGUO POR REAGENTES DE FENTON ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) OU POR $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ASCORBATO}$

O nome "reagentes de Fenton" se refere a uma mistura de sais ferrosos e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que agem como oxidantes em uma grande variedade de substratos. Fenton reportou em 1894 que, na presença de pequenas concentrações de sais ferrosos e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o ácido tartárico seria oxidado a ácido dihidroximaleico (FENTON, 1894). Anos depois, ele mostrou que alguns outros hidroxiácidos também eram oxidados na presença destes reagentes (FENTON, 1899). Em 1934, Haber e Weiss sugeriram que na decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalisada por sais de ferro o  $^\bullet\text{OH}$  seria formado por um intermediário ativo via oxidação do íon  $\text{Fe}^{2+}$  pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como mostrado na equação (1) (HABER; WEISS, 1934). A partir daí, diversos íons metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ ) foram relatados como oxidantes na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e por isso, na presença deste peróxido, passaram a ser referidos também como reagentes de Fenton (GOLDSTEIN *et al.*, 1993). A combinação das equações de Fenton e Haber-Weiss, frequentemente denominadas apenas como "reação de Fenton", passou então a ser reconhecida como uma importante reação oxidante cujo produto principal é o  $^\bullet\text{OH}$ .

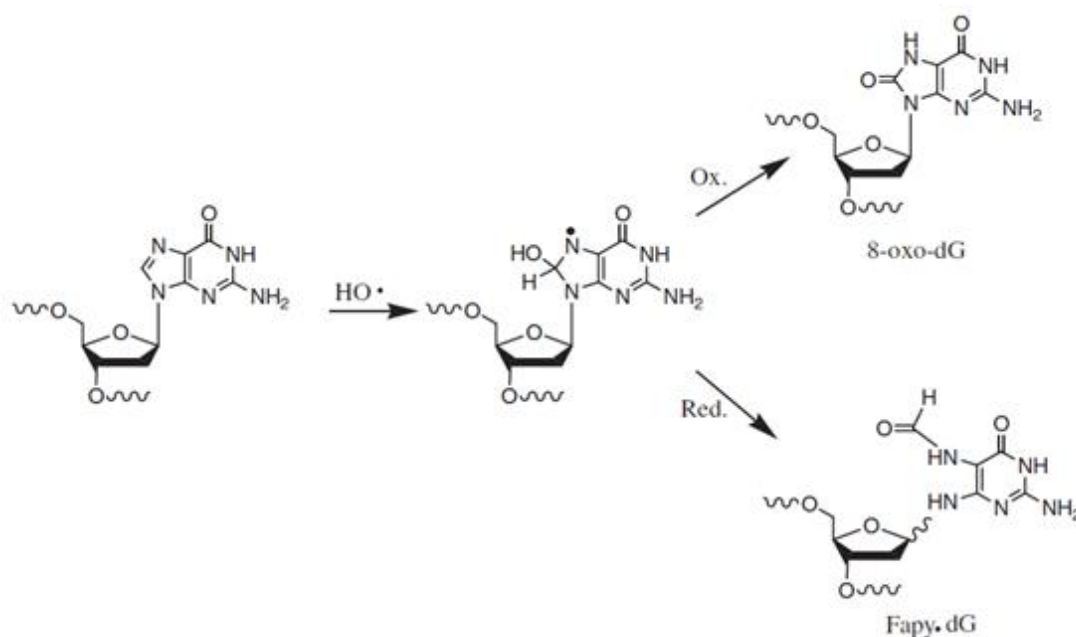


O radical  $\bullet\text{OH}$  é uma ROS altamente reativa na vizinhança de sua formação. Mesmo em ambiente celular, sua maior fonte é a reação de Fenton, que envolve a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com sítios redox ativos de metais, tais como  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$  (WINTERBOURN, 2008). Por isso, uma das principais linhas de defesa contra ROS em organismos aeróbios inclui quelantes metálicos e proteínas quelantes de metais, como a ferritina, além da catalase, enzima que catalisa a decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (CADET; WAGNER, 2013). O  $\bullet\text{OH}$  também pode ser formado pela hidrólise da água pela ação da radiação ionizante (VON SONNTAG, 2006).

Diferentemente do  $^1\text{O}_2$ , que possui um alvo exclusivo de oxidação, o  $\bullet\text{OH}$  pode reagir tanto com as bases quanto com os açúcares do DNA, não sendo a reação específica para nenhuma das espécies. A reação de  $\bullet\text{OH}$  e dGuo também pode gerar 8-oxodGuo. Contudo, ela só é o produto majoritário na presença de agentes redutores como ferro, cobre e ascorbato (CADET *et al.*, 1999). O mecanismo para tal ocorre de forma diversa, e há competição com um outro produto, a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina-2'-desoxiguanosina (Fapy-dGuo). Conforme pode ser observado na FIGURA 4, um centro de nitrogênio-radical, chamado de 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosil radical é um precursor comum para os dois produtos e a relativa quantidade de cada um é dependente das condições do meio. A formação de 8-oxodGuo ocorre por perda de um elétron do intermediário radical (oxidação), enquanto que para formação de Fapy-dGuo, há necessidade de adição de um elétron (redução) seguida de fragmentação do radical (GAJEWSKI *et al.*, 1990; KALAM *et al.*, 2006).

Os reagentes  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ /ascorbato são conhecidos por oxidar dGuo a 8-oxodGuo principalmente via geração de  $\bullet\text{OH}$ . Contudo, o uso de scavengers desta espécie não foi capaz de interromper toda esta oxidação (STOEWE; PRÜTZ, 1987). De fato, o que ocorre é que  $\text{Cu}^{2+}$  primeiro é reduzido a  $\text{Cu}^+$  pelo ascorbato e este reage com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando principalmente  $\bullet\text{OH}$ , embora outras espécies como o  $^1\text{O}_2$  também possam ser formadas durante este processo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

**FIGURA 4 - FORMAÇÃO DE FAPY-dGUO E DE 8-OXOdGUO PELO  $\cdot\text{OH}$**



FONTE: Modificada de Kalam *et al.* (2006) com a permissão de Oxford University Press.

NOTA: A reação de  $\cdot\text{OH}$  e dGuo também pode gerar 8-oxodGuo por oxidação do 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosil radical. Sua redução gera Fapy-dGuo.

### 3.2.3 OXIDAÇÃO DO DNA POR OXIGÊNIO SINGLETE

A oxidação do DNA por  $^1\text{O}_2$  tem sido intensamente revisada na literatura (JENA; MISHRA, 2011; AGNEZ-LIMA *et al.*, 2012; RAVANAT *et al.*, 2012; CADET; WAGNER, 2013). Novamente, é importante ressaltar que o  $^1\text{O}_2$  possui especificidade em reagir com a base púrica guanina (CADET; TEOULE, 1978; CADET *et al.*, 1997; RAVANAT *et al.*, 2000). O primeiro passo desta reação envolve uma cicloadição do tipo Diels-Alder [2+4] nas posições C4 e C8 da guanina, de modo similar ao que ocorre no nucleosídeo dGuo. Contudo, no caso do DNA, a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua) é o produto exclusivo dos diastereoisômeros 4,8-endoperóxidos formados na reação de cicloadição (SHEU; FOOTE, 1993). Além disso, sabe-se que a 8-oxoGua é reconhecida como o principal marcador de estresse oxidativo em DNA (RAVANAT *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.*, 2002; CADET; WAGNER, 2013).

Existe certa controvérsia na literatura em respeito à nomeação das lesões da guanina (Gua) e da dGua por  $^1\text{O}_2$ . Por exemplo, Kasai e Nishimura, que descobriram a lesão na base em 1983 (KASAI K; S., 1983), usam o termo 8-hidroxiguanina para lesões em DNA. Já os grupos de Cadet e Wagner (CADET; WAGNER, 2013) preferem o termo 8-oxoGua para a lesão na base e 8-oxodGua para a descrição da lesão em nucleosídeo (CADET; WAGNER, 2013). Neste trabalho, adotaremos a convenção de Cadet e Wagner. Contudo, nas situações nas quais a lesão em DNA tenha sido identificada após sua hidrólise em nucleosídeos, a lesão em Gua poderá ser referida como 8-oxodGua.

A comprovação de que o  $^1\text{O}_2$  gera 8-oxodGua no DNA celular foi obtida pela incubação de células com fonte desta ROS marcada isotopicamente com oxigênio-18. A detecção de 8-oxodGua marcada foi obtida por análise de cromatografia líquida de alta *performance* acoplada à espectrometria de massa *eletrospray* em tandem (HPLC-ESI/MS/MS) realizada após digestão enzimática do DNA isolado das células tratadas (RAVANAT *et al.*, 2000). Como a lesão foi de fato analisada em nucleosídeos, pois ocorreu após a digestão com nucleases e fosfatases, neste caso será referida como 8-oxodGua. A estratégia experimental utilizada pelos autores, ou seja, a utilização  $^{18}[^1\text{O}_2]$  excluiu a possibilidade de que as lesões observadas no DNA fossem uma consequência indireta do estresse oxidativo causado pelo  $^1\text{O}_2$  ao reagir com outras biomoléculas. Em outro trabalho, o tratamento de DNA de timo de bezerro em solução com gerador de  $^1\text{O}_2$  (DHPNO<sub>2</sub>) seguido da avaliação de diferentes lesões (dímeros ciclobutano de timina, 2,6-diamino-5-formamido-4-hidroxipirimidina, 5,6-dihidro-5,6-dihidroxitimidina, 5-formil-2'-desoxiuridina, 5-hidroxi-2'-desoxiuridina e 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiadenosina) permitiu demonstrar que a 8-oxodGua é produto principal da oxidação da dGua em DNA pelo  $^1\text{O}_2$  (RAVANAT *et al.*, 2001).

A fotossensibilização de células HeLa com azul de metileno 5  $\mu\text{mol/L}$  e luz UVA seguida da extração e hidrólise do DNA também revelou o produto 8-oxodGua (DEFEDERICIS *et al.*, 2006). Os autores deste último trabalho creditaram o dano oxidativo ao DNA à formação exclusiva de  $^1\text{O}_2$  por conta do aumento da detecção destes produtos na presença de água deuterada (a qual aumenta o tempo de vida do  $^1\text{O}_2$ ) e na diminuição da mesma na presença de azida sódica (inibidora das reações com  $^1\text{O}_2$ ). Porém, é importante ressaltar que a fotossensibilização do azul de metileno não desencadeia especificamente um mecanismo do tipo II (o qual gera

apenas  $^1\text{O}_2$ ), mas também um mecanismo do tipo I, o qual gera outros tipos de ROS (FOOTE, 1991).

A quebra de fita simples de DNA do tipo plasmidial induzida por  $^1\text{O}_2$  já foi relatada em alguns trabalhos mais antigos (DI MASCIO *et al.*, 1989b; DEVASAGAYAM *et al.*, 1991a). No entanto, pelo próprio modo de ação do  $^1\text{O}_2$ , atualmente acredita-se que a quebra de fita simples de DNA não possa ser obtida diretamente pela oxidação desta ROS, mas apenas pela ação do  $\cdot\text{OH}$ . O mecanismo de quebra direta consiste numa abstração do hidrogênio da 2'-desoxirribose, gerando radicais de carbono, os quais na presença de oxigênio podem ser convertidos e radicais peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ). Estes também são capazes de abstrair hidrogênios das pentoses, resultando em quebras de fita (KRYSTON *et al.*, 2011).

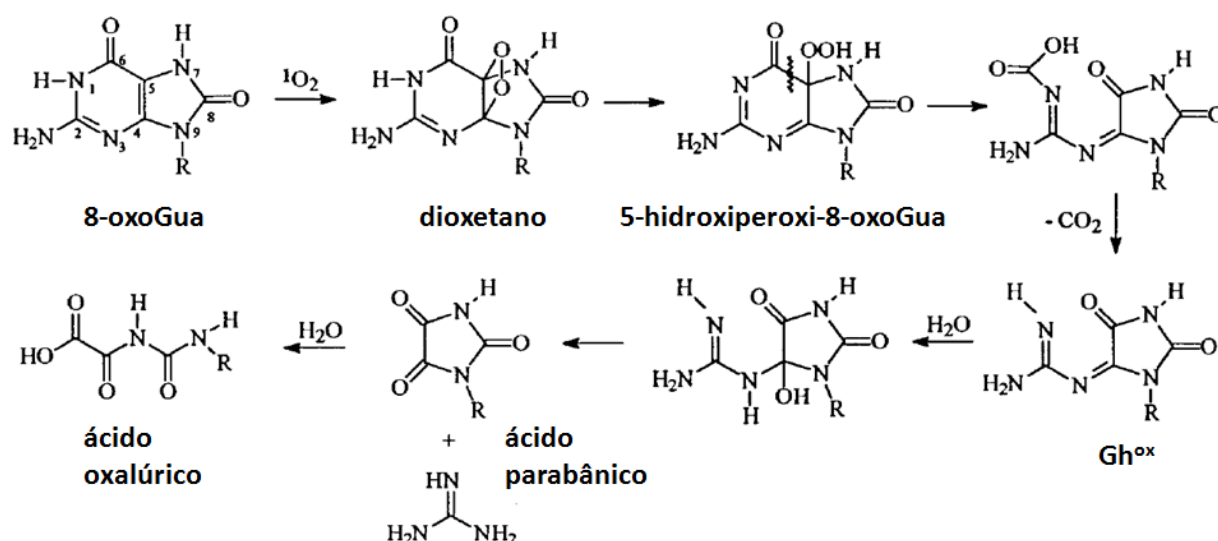
O que de fato deve ocorrer com o  $^1\text{O}_2$  é um mecanismo de quebra indireta, como oxidações que alterem a estrutura da fita. Em situações de adição de enzimas da maquinaria de reparo como a formamidopirimidina glicosilase (FPG) e a endonuclease III (endo III), ou em condições básicas, a geração das lesões poderia ser visualizada pela observação de quebra de fita simples em DNA do tipo plasmidial (RAVANAT *et al.*, 2012). Sendo assim, diversos autores utilizaram da adição destas enzimas para detectar oxidações do DNA por  $^1\text{O}_2$  através do mecanismo indireto de quebra de fita simples e/ou dupla (CARNEIRO *et al.*, 2010; SUZUKAWA *et al.*, 2012; PELLOSI *et al.*, 2014). Embora a FPG seja específica para purinas e a endo III para pirimidinas, ambas foram capazes de remover ácido oxalúrico ou oxazolona de DNA dupla fita, gerando evidência de que pequenas oxidações em purinas também possam ser reconhecidas pela enzima que primariamente é reconhecedora de danos em pirimidinas, a endo III (DUARTE *et al.*, 2000a).

O dano ao DNA celular por  $^1\text{O}_2$  também pode ser detectado indiretamente pelo ensaio do cometa (RAVANAT *et al.*, 2005; AZQUETA *et al.*, 2009; SUZUKAWA, 2012). Ravanat e colaboradores (RAVANAT *et al.*, 2005) utilizaram o ensaio do cometa associado às enzimas de reparo FPG e endo III para determinar o padrão oxidativo ao DNA por  $^1\text{O}_2$  gerado por  $\text{DHPNO}_2$ . Eles demonstraram que o número de quebra de fita e de sítios álcali-lábeis era bem menor que o número de sítios de danos sensível à FPG, os quais chegavam a 80% do total. Desta forma, concluíram que a geração de 8-oxodGuo foi a mais abundante, pois a mesma é a principal lesão reconhecida pela FPG.



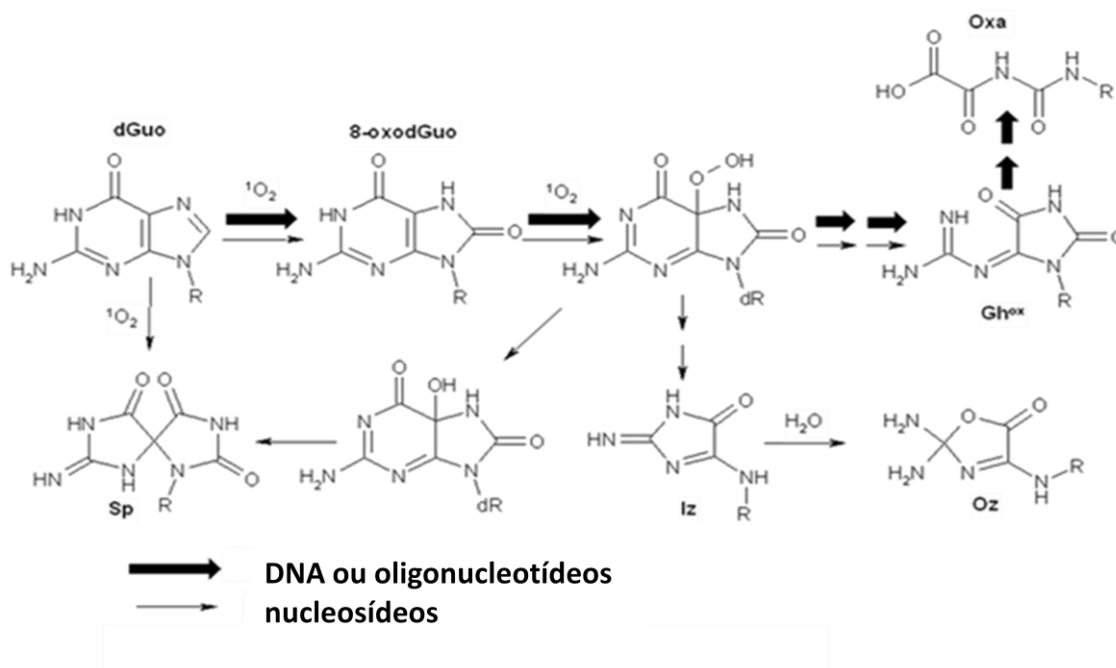
Assim como a 8-oxodGuo pode ser oxidada por uma nova molécula de  $^1\text{O}_2$ , o mesmo pode ocorrer com a 8-oxoGua. Duarte *et al.* conduziram um elegante estudo como intuito de identificar o produto final da oxidação da 8-oxoGua por  $^1\text{O}_2$  em DNA de fita simples. Para tanto, foram preparados oligonucleotídeos que já continham a lesão de 8-oxoGua e os mesmos foram oxidados com  $^1\text{O}_2$  proveniente da termodecomposição do DHPN $^{18}\text{O}_2$ . Os produtos de oxidação foram então analisados por cromatografia líquida de alta *performance* acoplada à espectrometria de massa *eletrospray* em tandem (HPLC-ESI/MS/MS). Os autores propuseram a formação de um dioxetano instável e sua subsequente conversão a 5-hidroperóxido. Este, por sua vez, sofre abertura do anel da pirimidina nas posições C5 e C6 seguida de descarboxilação, finalmente gerando como produto de oxidação estável a guanidinoidantoína, conforme pode ser observado no esquema da FIGURA 5. O resíduo de guanidinoidantoína oxidada ( $\text{Gh}^{\text{ox}}$ ) poderia sofrer hidratação, a qual levaria à liberação da guanidina e consequente formação de ácido oxalúrico, o produto final da reação (DUARTE *et al.*, 2000b). As similaridades e diferenças entre as reações de oxidação do nucleosídeos dGuo e da base guanina Gua por  $^1\text{O}_2$  podem ser melhor observadas na FIGURA 6.

FIGURA 5 - ESQUEMA DA OXIDAÇÃO DA 8-OXOGUA POR  $^1\text{O}_2$  EM DNA DE FITA SIMPLES



FONTE: Adaptada de Duarte *et al.*(2000b) com a permissão da American Chemical Society Copyright © 2000.

**FIGURA 6 - COMPARAÇÃO DOS MECANISMOS DE OXIDAÇÃO DA GUANINA POR  $^1\text{O}_2$  EM NUCLEOSÍDEOS E EM DNA**

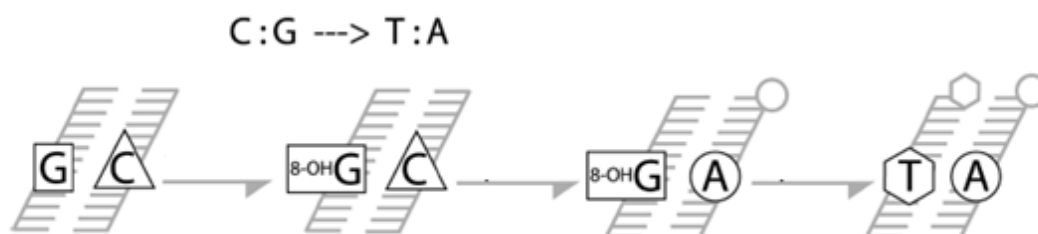


FONTE: Adaptada de Martinez *et al.* (2002).

NOTA: No caso específico de nucleosídeos, a dGua pode ser diretamente oxidada a diastereoisômeros de espiroiminodihidantoína (nesta figura representados por Sp), ou a 8-oxodGua. Esta, após adição de nova molécula de  $^1\text{O}_2$ , gera um 5-hidroperóxido capaz de formar dSp ou imidazolona (Iz), a qual se estabilizaria em oxazolona (Oz). No caso da Gua, ela seria oxidada principalmente a 8-oxoGua que, se oxidada por uma nova molécula de  $^1\text{O}_2$ , formaria guanidinodantoína oxidada ( $\text{Gh}^{\text{ox}}$ ) e seu produto estável ácido oxalúrico (Oxa).

A 8-oxoGua não reparada é capaz de parear com adenina e, um par que antes era G-C pode se tornar um par T-A na próxima replicação do DNA, como esquematizado na FIGURA 7. Este comportamento confere à 8-oxoGua um potencial altamente mutagênico (BOITEUX *et al.*, 1992). Caso a mutação ocorra em genes específicos, como aqueles que controlam o crescimento e a diferenciação celular, ou oncogenes e genes supressores tumorais, o risco de carcinogênese será aumentado consideravelmente (AMES, 1989; BOS, 1989).

**FIGURA 7 - TRANSVERSÃO DE GUANINA PARA TIMINA ORIGINADA A PARTIR DA FORMAÇÃO DE 8-OXodGUO**



FONTE: Adaptada de Hermes-Lima (2004) com a permissão de John Wiley and Sons Copyright © 2005.

NOTA: A oxidação de guanina a 8-oxoguanina fará com que este produto pareie com adenina ao invés de citosina. Após uma segunda replicação, o par que era G:C se transforma em T:A, consolidando a mutação.

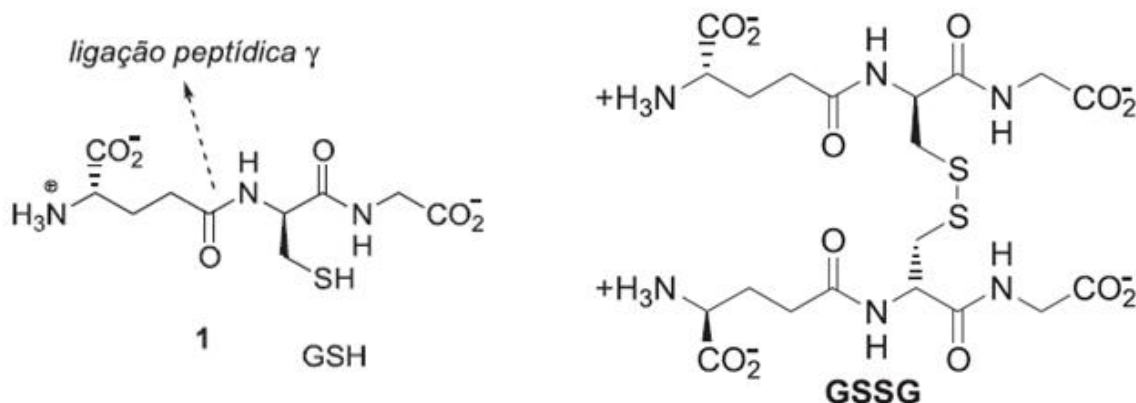
É importante ressaltar que nem todas as lesões oxidativas do DNA serão permanentes e danosas, pois as células dispõem de mecanismos e de enzimas específicas de reparo. Como exemplo, segue breve descrição das diferentes enzimas envolvidas no processo de reparo da 8-oxodGuo. A remoção da 8-oxodGuo do *pool* de nucleotídeos em procariotos é mediada pela enzima de reparo MutT (ou hMTH1 em humanos), que, por sua atividade de fosfatase, hidrolisa este nucleotídeo à sua forma monofosfato, impedindo que DNA polimerases utilizem este nucleotídeo modificado durante a replicação do DNA (MAKI; SEKIGUCHI, 1992). De fato, a oxidação do *pool* de nucleotídeos de guanina é apontada como uma contribuição importante pela morte causada por antibióticos bactericidas em função da geração de quebra de fitas de DNA pela incorporação excessiva da 8-oxodGTP no processo de replicação (FOTI *et al.*, 2012). As enzimas bacterianas envolvidas no reparo da 8-oxodGuo em DNA são a formamidopiridina-DNA-glicosilase (Fpg ou MutM) e MutY-glicosilase (em humanos hOGG1 e MUTYH, respectivamente). A Fpg remove 8-oxodGuo quando pareada com citosina e reconhece diversas lesões em purinas com o anel imidazol aberto (BOITEUX *et al.*, 1992). A MutY-glicosilase remove a adenina quando pareada com a 8-oxodGuo (MICHAELS *et al.*, 1992). Além do papel da 8-oxoguanina glicosilase (OGG1) no reparo por excisão de bases, também foi reportado que a ligação de alta afinidade entre o nucleotídeo modificado 8-oxoguanina e a OGG1 gera um complexo que é capaz de ativar GTPases da família do gene Ras canônico, sinalização celular e expressão genética, mostrando que a

formação e remoção de lesões no DNA vai além da simples relação com a mutagênese (BOLDOGH *et al.*, 2012).

### 3.3 GLUTATIONA

A glutatona (GSH) é reconhecida como um antioxidante biológico que não apenas detoxifica ROS diretamente, como também aumenta a habilidade funcional de outros antioxidantes cruciais, como as vitaminas C e E (BALD *et al.*, 2004). Ela é um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-Glu-L-Cys-Gly), como pode ser observado na FIGURA 8, e representa o mais importante tiol de baixa massa molecular presente nas células (HAYES; PULFORD, 1995), sendo também um elemento crítico na manutenção do balanço redox e das vias de regulação e de sinalização celular (HAYES; PULFORD, 1995; CNUBBEN *et al.*, 2001).

FIGURA 8 - ESTRUTURA DA GLUTATIONA



FONTE: Adaptado de *Quim.Nova* **2008**, 31, 1170, com permissão da Sociedade Brasileira de Química.

NOTA: GSH corresponde à glutatona reduzida e GSSG à glutatona oxidada.

Os níveis de GSH são sustentados por um sistema múltiplo de enzimas: a  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT), a glutatona sintetase (GS), a glutatona peroxidase (GPx ou GSH-Px), a glutatona redutase (GR) e a  $\gamma$ -glutamyl cisteinyl sintetase ( $\gamma$ -GCS). A última é composta por uma subunidade pesada catalítica e por uma subunidade leve regulatória, é a de maior importância por ser limitante na reação de síntese. Os principais mecanismos de indução da transcrição da  $\gamma$ -GCS são modificações de tióis em sítios regulatórios críticos de proteínas e geração de ROS (WILD; MULCAHY, 2000). Contudo, já foi proposto que sob certas circunstâncias a

síntese de glutathione possa ocorrer apenas na presença de  $\gamma$ -GT e GS, sem a necessidade de  $\gamma$ -GCS (HAYES; MCLELLAN, 1999). Embora sintetizada no citosol, a glutathione está distribuída de maneira diferente nos vários compartimentos subcelulares, tais como citosol, mitocôndrias, retículo endoplasmático e núcleo, gerando diferentes *pools* redox. Na maioria das situações, o *pool* citosólico contém cerca de 70% da glutathione celular total, e os 30% restantes estão divididos entre o núcleo e os demais compartimentos citoplasmáticos (LLUIS *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, acredita-se no conceito que a GSH pode se difundir livremente entre o citoplasma e o núcleo celular através dos poros nucleares (GARCÍA-GIMÉNEZ *et al.*, 2013). Contudo, alguns trabalhos mostraram que a concentração de GSH pode ser 4 vezes maior no núcleo que no citoplasma, o que sugere a existência de um mecanismo de bombeamento de GSH para o núcleo contra um gradiente de concentração (MARKOVIC *et al.*, 2007; VIVANCOS *et al.*, 2010). O mecanismo proposto foi o de que proteínas Bcl-2, as quais possuem um domínio BH-3 que se liga à GSH, sejam os transportadores de glutathione para o núcleo (GARCÍA-GIMÉNEZ *et al.*, 2013). De fato, já foi demonstrado que a quantidade de glutathione nuclear estava aumentada em células cancerígenas com maior expressão de Bcl-2 (VOEHRINGER *et al.*, 1998). Mas, até o momento, o transporte de GSH por Bcl-2 só foi confirmado como ocorrendo do citosol para mitocôndrias (ZIMMERMANN *et al.*, 2007).

A GSH pode agir como um antioxidante de primeira linha de defesa ao ser um co-fator para a redução de peróxidos com a concomitante formação de glutathione dissulfeto (GSSG) mediada por GPx (CNUBBEN *et al.*, 2001). Para que a atividade antioxidante seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico, representado na FIGURA 9. Nele podemos identificar a atividade de três grupos de enzimas: a glutathione oxidase (GO), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione redutase (GR). As duas primeiras enzimas, GO e GSH-Px, catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a última, GR, é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (HUBER *et al.*, 2008).

FIGURA 9 - CICLO CATALÍTICO DA GLUTATIONA



FONTE: Adaptado de *Quim.Nova* **2008**, 31, 1170, com permissão da Sociedade Brasileira de Química.

NOTA: O ciclo catalítico da glutatona por meio da atuação das enzimas GSH-Px, GR e GO.

LEGENDA: GSH-Px: glutathione peroxidase, GR: glutathione reductase e GO: glutathione oxidase.

No núcleo, a GSH também pode estar envolvida com processos fisiológicos tais como ciclo e morte celular. O seqüestro de GSH para o núcleo durante a proliferação de células animais e vegetais sugere a existência de um mecanismo redox de regulação do DNA na mitose comum a todos os eucariotos. A glutatona pode agir como um sensor redox no início da síntese do DNA com a função de manter a arquitetura nuclear ao fornecer o ambiente redox apropriado para a integridade e replicação do DNA. A GSH nuclear também pode estar envolvida em fenômenos epigenéticos e no controle da degradação de proteínas nucleares pelo proteassoma. Além disso, o aumento da GSH no *pool* nuclear e a conseqüente redução das pontes dissulfeto em proteínas nucleares criam um ambiente redox apropriado para o estímulo da descompactação da cromatina no início da proliferação celular (GARCÍA-GIMÉNEZ *et al.*, 2013).

Ademais, a GSH também protege as células contra produtos tóxicos com a participação das enzimas glutathione-S-transferases (GSTs). As GSTs são um conjunto de enzimas estruturalmente diversas que agem contra produtos reativos produzidos *in vivo* como resultado de quebras de macromoléculas resultantes de situações de estresse oxidativo. Elas também são capazes de detoxificar metabólitos de xenobióticos (HAYES; PULFORD, 1995).

### 3.4 GLUTATIONA, OXIGÊNIO SINGLETE E LESÕES AO DNA

A relação entre GSH e  $^1\text{O}_2$  é um pouco controversa. Sabe-se que a própria GSH poderia gerar  $^1\text{O}_2$  quando em contato com ânion superóxido (WEFERS; SIES, 1983). A GSH foi ainda reportada como detentora de atividade *quencher* de  $^1\text{O}_2$  (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991c). Nesse trabalho, os autores geraram  $^1\text{O}_2$  através da decomposição térmica do endoperoxídeo de 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio (NDPO<sub>2</sub>) e testaram o efeito de diversos tióis, incluindo a GSH, em função do tempo e do pH. A participação de outras ROS foi descartada pela ausência de efeito após adição de *scavengers* específicos e a de  $^1\text{O}_2$  foi confirmada pela ação de azida ( $\text{NaN}_3$ ), a qual possui reconhecida função específica contra esta espécie. Todos os tióis se mostraram *quenchers* efetivos de  $^1\text{O}_2$  e esta propriedade aumentou com o aumento do pH.

Abordando mais especificamente a questão do efeito que a GSH poderia promover ao DNA danificado por  $^1\text{O}_2$ , DNA de fita simples foi tratado com NDPO<sub>2</sub>, GSH e também com azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) e os resultados variaram com a concentração de GSH testada (LAFLEUR *et al.*, 1994). Primeiramente, a GSH pareceu proteger o DNA na concentração de 25 mmol/L, mas exercia efeitos danosos sobre o mesmo quando aplicada em concentrações superiores a 40 mmol/L. De modo interessante, a concentração de 25 mmol/L de GSH também foi capaz de aumentar a formação de quebras na fita simples de DNA. Segundo cálculos dos autores, apenas cerca de 2% da quebra de fita do DNA seria devido ao  $^1\text{O}_2$  sozinho e a associação entre  $^1\text{O}_2$  e GSH corresponderia a 10% do total de quebra. Em contraste com alguns destes resultados, foi demonstrado que concentrações crescentes e fisiológicas de GSH (0,1-10 mmol/L) concomitantes com NDPO<sub>2</sub> já foram suficientes para aumentar a formação de quebra de fita simples de DNA plasmidial em porcentagem de até 27% acima da quebra derivada apenas do gerador de  $^1\text{O}_2$ . GSSG e outros sulfetos mostraram-se praticamente inativos. A adição de superóxido dismutase não evitou as quebras originadas por NDPO<sub>2</sub> ou por NDPO<sub>2</sub> e GSH. A adição de catalase ofereceu alguma proteção, mas provavelmente por mecanismo de *quenching* físico, pois o mesmo efeito foi observado com o uso de catalase desnaturada pelo calor. Já a azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ), *quencher* de  $^1\text{O}_2$ , inibiu em 73% as quebras induzidas por NDPO<sub>2</sub> e em 47% aquelas promovidas por

NDPO<sub>2</sub> e GSH. O acréscimo de manitol (*scavenger* de <sup>•</sup>OH) ao sistema protegeu em menor extensão a formação de quebras de fita simples por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (20%) e em maior extensão as quebras originadas da interação entre <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e GSH (55%) (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991a). Contudo, hoje é sabido que o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> não é capaz de gerar, por si só, quebras de fita no DNA. Por isso, a quebra observada pelos grupos de Lafleur e Devasagayam pode ser devida a reagentes da síntese do NDPO<sub>2</sub> que permaneceram em excesso na solução de endoperóxido.

Concentrações de GSH também condizentes com aquelas regularmente encontradas nos organismos (10 mM) foram relatadas como sendo capazes de ampliar em aproximadamente quatro vezes a geração de 8-oxodGuo induzida por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> em dGuo (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991b). Neste mesmo estudo, a modulação da formação de 8-oxodGuo pelo tiol ditioneitol (DTT) mostrou-se dependente de pH, mesmo numa região em que as espécies envolvidas estão totalmente protonadas. Apesar de os autores não terem explicado tais resultados, acreditamos que a diminuição da detecção de 8-oxodGuo em valores de pHs superiores a 7 possa ser devido a uma mudança de mecanismo, ou seja, a 8-oxodGuo pode estar sendo reoxidada a outros produtos, como dSp e dOz, e por isso teria seu sinal diminuído.

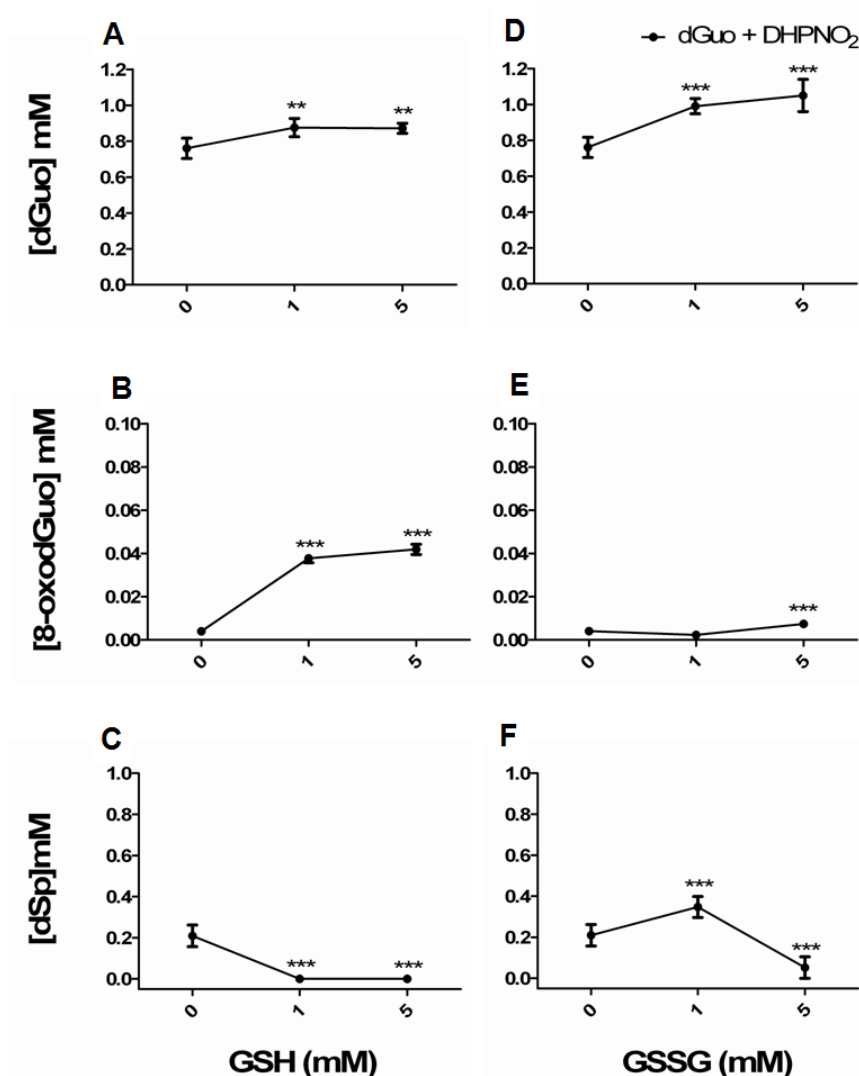
Foi observado um aumento significativo na produção de ROS endógenas e de hidroperóxidos, concomitantemente com uma diminuição no conteúdo GSH em células HL-60 tratadas com inibidores da superóxido dismutase, da catalase e da isocitrato desidrogenase e expostas a <sup>1</sup>O<sub>2</sub> obtido por fotossensibilização de rosa bengala (KIM *et al.*, 2006). Os autores justificaram estes resultados sugerindo que a ação enzimática dos antioxidantes protege as células dos efeitos citotóxicos do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Como as enzimas antioxidantes agem juntas, a inativação de uma delas pode afetar todo o sistema de defesa. Assim, os autores sugeriram que o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> modula o balanço redox celular através da depleção dos níveis de GSH.

Resultados obtidos anteriormente sobre a oxidação da dGuo por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e sobre os efeitos que a adição de GSH ou GSSG causa no sistema mostraram que a incubação de dGuo com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> obtido a partir da termodecomposição do DHPNO<sub>2</sub> gerou os produtos oxidados dSp e 8-oxodGuo, sendo a dSp 50 vezes mais abundante que 8-oxodGuo (PERES, 2012; PERES *et al.*, 2015). O favorecimento da formação de dSp é conhecido e explicado, pelo menos em parte, como devido à reoxidação imediata da 8-oxodGuo recém-formada à dSp, por uma segunda



molécula de  $^1\text{O}_2$  (MARTINEZ *et al.*, 2002). Contudo, a adição de GSH ou GSSG ao sistema inverteu as proporções entre os produtos de oxidação, aumentando a formação de 8-oxodGuo e diminuindo a geração de dSp. A adição dos tióis também preveniu, em parte, a oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$ . Estes resultados, apresentados na FIGURA 10, sugeriram a hipótese que a GSH previna a oxidação de 8-oxodGuo em detrimento da oxidação da dGuo (PERES, 2012). O estudo desta hipótese é um dos principais objetivos do presente trabalho.

FIGURA 10 - EFEITO DA ADIÇÃO DE GSH E DE GSSG NA OXIDAÇÃO DA dGUO POR  $^1\text{O}_2$



FONTE: Reproduzida de Peres *et al.* (2015) com a permissão de Elsevier Copyright © 2015.

NOTA: Incubação de dGuo 1 mmol/L, DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L e GSH ou GSSG 1 ou 5 mmol/L por 2,5 h a 37 °C. Os resultados foram obtidos por HPLC e representam média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes com  $p < 0.001$ .

LEGENDA: A, B e C) Soluções com presença de GSH 1 e 5 mmol/L, conforme indicado na figura. D, E e F) Soluções com presença de GSSG 1 e 5 mmol/L, conforme indicado na figura.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Síntese de DHPNO<sub>2</sub>

O reagente DHPN e o DHPN<sup>18</sup>O<sub>2</sub> foram sintetizados em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Paolo Di Mascio, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela Dra. Alexsandra Scalfo. O DHPNO<sub>2</sub>, por sua vez, foi sintetizado por fotossensibilização do DHPN (PIERLOT *et al.*, 2000) num sistema contendo 2 mL de água deuterada (a qual aumenta o tempo de vida do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e 5 µL de azul de metileno 10 mg/mL e 200 mg de DHPN. A reação se processou a 4°C, sob o borbulho de O<sub>2</sub> e irradiação de uma lâmpada de 500 W. Após 3 horas, a absorbância de uma alíquota diluída 5000x da solução foi medida em 288 nm ( $\epsilon_{\text{DHPN}}=7780 \text{ cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}.\text{L}$ ), incubada a 60°C por 1 h e medida novamente. A absorbância em 288 nm indica a quantidade de DHPN em solução, a qual se espera que seja menor logo após a reação de síntese e maior após a incubação a 60°C, pois o calor induz a conversão de DHPNO<sub>2</sub> em DHPN e O<sub>2</sub>. Assim, a concentração de DHPNO<sub>2</sub> é uma função da diferença destas absorbâncias. Esta avaliação foi refeita a cada 1 hora, até que o DHPNO<sub>2</sub> tivesse níveis aceitáveis de concentração ( $\geq 150 \text{ mmol/L}$ ) e de rendimento ( $\geq 85\%$ ). Posteriormente, o produto final foi armazenado a -80°C.

### 4.2 Síntese de dSp

Os diastereoisômeros dSp foram sintetizados em um sistema semelhante ao do DHPNO<sub>2</sub>, por fotossensibilização de uma solução composta de 5 mL de dGuo 10 mmol/L e 20 µL de azul de metileno 5 mg/mL por uma lâmpada de 500 W, sob borbulho de O<sub>2</sub> e temperatura constante de 15°C (RAVANAT; CADET, 1995; NILES *et al.*, 2001). A solução resultante foi então purificada em HPLC por coluna Luna LC-NH<sub>2</sub> Phenomenex (250 x 4,6 mm, 5 µm) sob fluxo de 0,8 mL/min e fase móvel constituída por 65 % de acetonitrila, 25% de formiato de amônio 25 mmol/L e 10% de metanol. Depois de liofilizada e da adição de água ultra pura, a solução teve sua absorbância aferida em espectrofotômetro em 230 nm. A partir deste valor e de seu

coeficiente de absorvidade ( $\epsilon_{dSp}=5240 \text{ cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}.\text{L}$ ) sua concentração foi calculada e a solução foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3 Síntese de 8-oxodGuo**

#### **4.3.1 Oxidação da dGuo por $\text{Fe}^{2+}$ ou $\text{Cu}^{2+}$ e $\text{H}_2\text{O}_2$ /ascorbato**

Após extensa pesquisa bibliográfica, duas reações foram escolhidas como padrões para serem modificadas para obtenção de maior rendimento, as quais foram denominadas reações I (KASAI; NISHIMURA, 1984) e II (SINGH *et al.*, 2003). A partir delas, foram preparadas variações, denominadas reações III, IV, V, VI, VII, VIII, IX e X, cujos reagentes e condições estão apresentadas na TABELA 3.

TABELA 3 - DESCRIÇÃO DAS DIFERENTES REAÇÕES DE SÍNTESE DE 8-OXOdGUO

Reação	Composição	Condição
<b>I</b> (Fe <sup>2+</sup> /ASC/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2,5 mmol/L dGuo + ácido ascórbico 14 mmol/L + EDTA 6,5 mmol/L + FeSO <sub>4</sub> 1,3 mmol/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 mmol/L + PBS	Aquecimento a 37°C sob agitação por 3 h.
<b>II</b> (Cu <sup>2+</sup> /ASC/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3,7 mmol/L dGuo + 10 mmol/L ácido ascórbico + 1,2 mmol/L CuSO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5%	Temperatura ambiente por 15 min.
<b>III</b> (Fe <sup>2+</sup> /ASC/O <sub>2</sub> )	2,5 mmol/L dGuo + 70 mmol/L ácido ascórbico + 6,5 mmol/L EDTA + 1,3 mmol/L FeSO <sub>4</sub> + O <sub>2</sub>	Aquecimento a 37°C por 3 h sob borbulho de O <sub>2</sub> .
<b>IV</b> (Fe <sup>2+</sup> /ASC/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2,5 mmol/L dGuo + 70 mmol/L ácido ascórbico + 6,5 mmol/L EDTA + 1,3 mmol/L FeSO <sub>4</sub> + 50 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aquecimento a 37°C sob agitação por 3 h.
<b>V</b> (Cu <sup>2+</sup> /ASC/O <sub>2</sub> )	2,5 mmol/L dGuo + 70 mmol/L ácido ascórbico + 6,5 mmol/L EDTA + 1,3 mmol/L CuSO <sub>4</sub> + O <sub>2</sub>	Aquecimento a 37°C por 3 h sob agitação e borbulho de O <sub>2</sub> .
<b>VI</b> (Cu <sup>2+</sup> /ASC/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2,5 mmol/L dGuo + 70 mmol/L ácido ascórbico + 6,5 mmol/L EDTA + 1,3 mmol/L CuSO <sub>4</sub> + 50 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Aquecimento a 37°C sob agitação por 3 h.
<b>VII</b> (Cu <sup>2+</sup> /ASC/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	2,5 mmol/L dGuo + 140 mmol/L ácido ascórbico + 1,3 mmol/L CuSO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5%	Aquecimento a 37°C sob agitação por 15 min, 1h ou 3h.
<b>VIII</b> (Cu <sup>2+</sup> /ASC/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3,7 mmol/L dGuo + 140 mmol/L ácido ascórbico + 1,3 mmol/L CuSO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5%	Aquecimento a 37°C sob agitação por 1 h.
<b>IX</b> (Cu <sup>2+</sup> /ASC/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3,7 mmol/L dGuo + 140 mmol/L ácido ascórbico + 10 mmol/L CuSO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5%	Aquecimento a 37°C sob agitação por 1 h.
<b>X</b> (Cu <sup>2+</sup> /ASC/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3,7 mmol/L dGuo + 140 mmol/L ácido ascórbico + 1,3 mmol/L CuSO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10%	Aquecimento a 37°C sob agitação por 1 h.

FONTE: O autor (2016).

#### 4.3.2 Pré-purificação da 8-oxodGuo

Foi adicionada como rotina uma etapa de pré-purificação imediatamente depois da síntese para evitar a degradação da 8-oxodGuo após sua coleta e liofilização. Para tanto, as amostras da síntese foram pré-purificadas em colunas C18 Bond Elut de 500 mg e 3 mL de capacidade (Agilent Technologies). Previamente à pré-purificação, as colunas foram preparadas com 3 mL de água ultra pura e, após a injeção de 500 µL de solução de síntese e do descarte do eluato, seguiu-se a injeção de 1mL de metanol 5%, seu descarte, a injeção de 1 mL de

metanol 7%, seu descarte, e finalmente a injeção final de 1 mL de metanol 10%, seguida da coleta do eluato. Este processo mostrou-se imprescindível para impedir que a reação de oxidação continuasse oxidando a 8-oxodGuo recém-sintetizada em outros produtos. Em seguida, o eluato foi purificado e a concentração de 8-oxodGuo foi determinada conforme o item 4.3.3 da seção Material e Métodos.

#### 4.3.3 Detecção e quantificação da dGuo e da 8-oxodGuo

A 8-oxodGuo e sua precursora dGuo foram detectadas por HPLC usando uma coluna Thermo C18 (250 x 2.1 mm, 5  $\mu$ m) sob um fluxo de 0,2 mL/min e um detector UV em 254 nm. Foram testadas duas condições de fase móvel, denominadas condição I e condição II. A condição I era determinada por um fluxo isocrático composto de metanol 15%. A condição II era composta por um gradiente de ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B), da seguinte forma: 0 – 20 min, 5% B; 20 min, 15% B; 25 min, 20% B e 30 min, 5% B. Foi observada uma melhor separação entre dGuo e 8-oxodGuo sob a condição II. A síntese de 8-oxodGuo foi ainda confirmada por espectrômetro de massas micrOTOF Q-II no modo positivo nas condições de 180 °C e -4,5 kV. A concentração de 8-oxodGuo foi determinada através do seu coeficiente de extinção molar no comprimento de onda de 293 nm ( $\epsilon_{293}$  8-oxodGuo = 9700.cm<sup>1</sup>.mol<sup>-1</sup>.L) (MARTINEZ, 2003).

#### 4.4 Incubação de GSH ou GSSG com dGuo ou 8-oxodGuo e DHPNO<sub>2</sub> ou DHPN<sup>18</sup>O<sub>2</sub>

Foram preparadas soluções contendo dGuo 1 mmol/L, GSH ou GSSG 1 ou 5 mmol/L e DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L em água deuterada. As soluções foram incubadas a 37°C sob agitação branda por 2,5 h, tempo necessário para completa decomposição do endoperóxido, com rendimento de geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> de 60% (PIERLOT *et al.*, 2000). Também foram preparadas, sob as mesmas condições, soluções com 8-oxodGuo ao invés de dGuo e com DHPNO<sub>2</sub> marcado com oxigênio 18 (DHPN<sup>18</sup>O<sub>2</sub>) no lugar de DHPNO<sub>2</sub>.

#### 4.5 Detecção de dGuo e de seus produtos de oxidação

A detecção de dGuo e de seus produtos de oxidação foi realizada por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC), tendo como base o espectro de absorbância de cada uma destas substâncias. A quantificação foi feita em comparação com uma curva de calibração com diferentes concentrações do padrão de cada produto, de forma que a concentração final foi obtida pela relação com a área do pico observado, com a devida confirmação do espectro de absorbância e do tempo de retenção. Em todos os casos foram injetados 20 µL de padrão e de amostra, com exceção da detecção de 8-oxodGuo em DNA, no qual foram injetados 50 µL de padrão e de amostra.

A detecção e a quantificação de dGuo e dos diastereoisômeros de dSp foram realizadas conforme já descrito (MARTINEZ *et al.*, 2002). A coluna utilizada foi a Phenomenex LC-NH<sub>2</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm). A mesma foi mantida a 30°C e submetida a um fluxo de 0,8 mL/min de fase móvel composta por 65% de acetonitrila, 25% de formiato de amônio 25 mmol/L e 10% de metanol. A detecção da dGuo foi acompanhada em detector UV a 254 nm e a formação de diastereoisômeros de dSp foi monitorada a 230 nm. O limite de detecção de dSp foi de 13,2 µmol/L. As amostras padrão da curva de calibração de dGuo tinham as concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mmol/L. As amostras padrão da curva de calibração de dSp tinham as concentrações de 0,0125; 0,0132; 0,125; 0,132; 0,625; 0,88 e 1,25 mmol/L.

No caso da 8-oxodGuo, sua formação foi revelada por HPLC com detector eletroquímico ESA Colouchem III (EC) com potenciais de 130 e 380 mV para E1 e E2, respectivamente (EBLIN *et al.*, 2006). A coluna utilizada foi a ACE LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), a qual foi mantida a 30°C sob fluxo de 0,8 mL/min com fase móvel constituída por 10% de metanol e 90% de solução de ácido cítrico 4 mmol/L, acetato de amônio 8 mmol/L e EDTA 20 mg/L em pH 4,0. O limite de detecção foi de 0,05 µmol/L. A cada sexteto de amostras foi realizada a limpeza da coluna através de um gradiente de metanol entre 10 e 70% durante 25 minutos, para retirada de DHPN retido. As amostras padrão da curva de calibração de 8-oxodGuo tinham as concentrações de 0,001; 0,002; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mmol/L.

A detecção de 8-oxodGuo marcada com oxigênio 18 ( $[^{18}\text{O}]8\text{-oxodGuo}$ ), resultante da incubação com  $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ , foi realizada através de HPLC acoplado a espectrômetro de massas micrOTOF Q-II no modo positivo. Para tanto, foi utilizada uma coluna C18 BDS Hypersil (250 x 2,1 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), submetida a um fluxo de 0,2 mL/min de uma fase móvel composta de gradiente de ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B), como segue: 0-20 min, 5% B; 20 min, 15% B; 25 min, 20% B 30 min, 5% B. Os seguintes parâmetros foram utilizados: energia de colisão de 3 eV, nebulizador em 4 Bar, fluxo de 8 L/min de gás e temperatura de 240 °C. Neste caso, foram injetados 50  $\mu\text{L}$  de amostra. Os espectrômetros de massa revelam seus resultados em termos da relação entre a massa e a carga (relação  $m/z$ ) de cada substância, de modo que a diferença em um único átomo pode ser identificada. A 8-oxodGuo possui uma  $m/z$  de 284 e a  $[^{18}\text{O}]8\text{-oxodGuo}$  possui uma  $m/z$  de 286, já que a única diferença entre elas é a presença de uma molécula de  $^{18}\text{O}$  no lugar de  $^{16}\text{O}$ .

#### 4.6 Quantificação do conteúdo residual de GSH/GSSG em solução

As amostras incubadas com GSH ou com GSSG tiveram seu conteúdo final de GSH e de GSSG verificado após a incubação, visando detectar possíveis reações de oxirredução. O conteúdo final de GSH/GSSG foi detectado por HPLC usando um detector UV em 215 nm e uma coluna Hypersil Gold C-18 (250 x 4,6 mmol/L, 5  $\mu\text{m}$ ), sob fluxo de 0,8 mL/min. A fase móvel consistiu em 5% de metanol e 95% de uma solução composta por ácido fórmico 50 mmol/L e octanossulfonato 50  $\mu\text{mol/L}$  em pH 2,7. Foram injetados 20  $\mu\text{L}$  das soluções teste e das soluções padrão. As amostras padrão da curva de calibração de GSH/GSSG tinham as concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mmol/L nas incubações com 1 mmol/L e 1, 2, 3, 4 e 5 mmol/L nas incubações com 5 mmol/L. No caso específico das amostras de DNA, cuja análise do conteúdo residual de GSH/GSSG foi feita após precipitação do DNA com isopropanol 1:1, as amostras padrão também continham isopropanol 1:1.

#### 4.7 Quantificação do $^1\text{O}_2$ produzido por irradiação com rosa bengala

A quantificação do  $^1\text{O}_2$  produzido após a irradiação com rosa bengala foi realizada com base no fato de que o álcool furfurílico (FFA) reage com o  $^1\text{O}_2$

imediatamente formado (HAAG *et al.*, 1984). Para tanto, foi usado FFA na concentração de 2 mmol/L, que é muito próximo ao seu valor  $\beta$  (concentração necessária para o FFA reagir com 50% do  $^1\text{O}_2$  presente). Assim, a concentração de  $^1\text{O}_2$  formado seria o dobro daquela de FFA consumido.

Foram então preparadas soluções com FFA 2 mmol/L na presença ou ausência de rosa bengala 10 ou 20  $\mu\text{mol/L}$  e as mesmas foram dispostas em placas de 24 poços e irradiadas por 15, 30, 60 ou 90 min em câmara com LEDs verdes com pico de emissão em 526 nm, específico para a geração de  $^1\text{O}_2$ . Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  das soluções foram injetados no HPLC sob fluxo de 0,2 mL/min de fase móvel constituída por 50 % de metanol e 50 % de água ultra pura. A detecção de FFA foi realizada por uma coluna Thermo C18 (250 x 2.1 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e por detector UV em 220 nm.

#### **4.8 Irradiação de DNA de timo de bezerro com rosa bengala**

Com base nos testes de quantificação da produção de  $^1\text{O}_2$  por fotossensibilização do rosa bengala (item 4.7 da seção Material e Métodos) e visando chegar a uma produção final de  $^1\text{O}_2$  3 mmol/L, a irradiação de 500  $\mu\text{L}$  de uma solução estoque de DNA 2 mg/mL foi feita em câmara com LEDs verdes com pico de emissão em 526 nm pela adição de rosa bengala 20  $\mu\text{mol/L}$  por 115 minutos. Às soluções teste, foram adicionadas GSH ou GSSH nas concentrações de 1 ou 5 mmol/L. As amostras foram divididas em irradiadas e não irradiadas, as últimas sendo controles realizados protegidos da luz.

#### **4.9 Hidrólise de DNA de timo de bezerro**

A hidrólise do DNA foi realizada em três etapas. Primeiramente, 200  $\mu\text{L}$  da solução utilizada na irradiação de DNA (conforme item 4.8 da seção de Material e Métodos), a qual continha 200  $\mu\text{g}$  de DNA, foi incubada com solução de enzima nuclease P1 0,5 U/ $\mu\text{L}$  em tampão composto por acetato de sódio 250 mmol/L e acetato de zinco 1 mmol/L em pH 4,8 a 50°C por 1 h. Em seguida, aos 250  $\mu\text{L}$  da incubação anterior, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução de fosfatase 0,1 U/ $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$  de tampão Tris 1 mol/L em pH 7,4 e 10  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. A nova solução foi



incubada a 37° C por 1 h. Por último, as amostras foram centrifugadas a 10510 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado e teve sua concentração de dGuo e de 8-oxodGuo verificadas por HPLC conforme o item 4.5 da seção de Material e Métodos.

#### **4.10 Precipitação de DNA de timo de bezerro**

Para que fosse realizada a dosagem do conteúdo residual de GSH/GSSG nas amostras incubadas com DNA, primeiramente este precisou ser precipitado. A precipitação ocorreu pela adição de 250 µL de isopropanol grau HPLC a igual volume de amostras após incubação. Em seguida, os 500 µL finais de amostra foram gentilmente vertidos por 10 vezes e centrifugados a 17760 g a 4°C por 2 min. O DNA ficou retido no precipitado e o sobrenadante foi utilizado para verificação do conteúdo residual de GSH/GSSG conforme item 4.6 da seção de Material e Métodos. Este procedimento foi necessário para evitar entupimento da coluna do HPLC pelo DNA.

#### **4.11 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada por teste ANOVA seguido por Tukey como *post hoc*, ou por teste t, através do programa *GraphPad Prism 6*. Foram considerados significativos valores de  $p \leq 0,05$ . Os controles utilizados em cada teste estão especificados nas legendas das figuras.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Aumento da geração de 8-oxodGuo na oxidação da dGuo por $^{18}[^1\text{O}_2]$ na presença de GSH ou GSSG

O aumento da formação de 8-oxodGuo na presença de GSH ou GSSG avaliado anteriormente por HPLC (PERES, 2012; PERES *et al.*, 2015) foi confirmado por marcação isotópica do  $^{18}\text{O}$  em HPLC acoplado a micrOTOF Q-II (FIGURA 11). Neste caso, dGuo 1 mmol/L foi incubada com  $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$  5 mmol/L ao invés de  $\text{DHPNO}_2$  e foram retiradas alíquotas da solução em 5, 10, 15 e 150 min, visando um estudo cinético da formação de 8-oxodGuo.

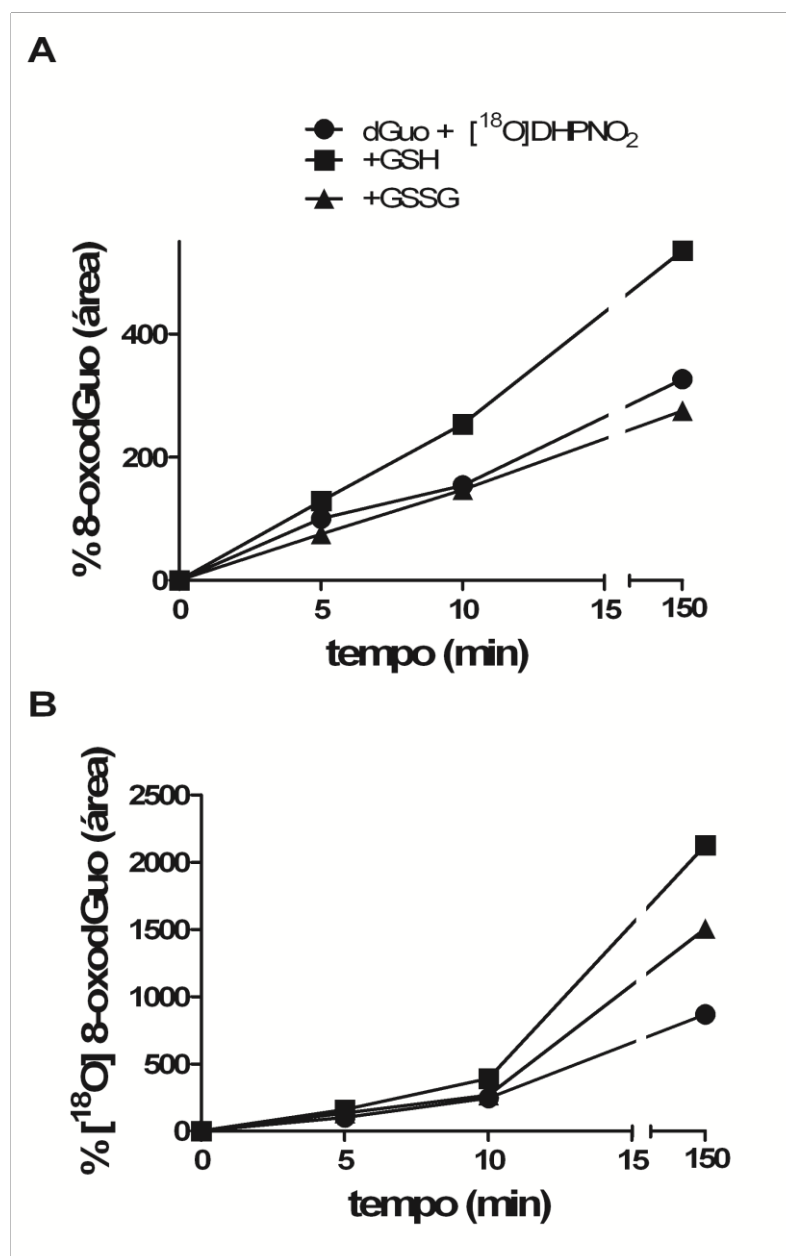
A modificação isotópica deveria gerar apenas  $[^{18}\text{O}]$  8-oxodGuo, pois a oxidação da dGuo em 8-oxodGuo é proveniente da molécula de  $^1\text{O}_2$  da termodecomposição do  $\text{DHPNO}_2$  e, neste caso, ela estaria marcada com  $^{18}\text{O}$  ( $^{18}[^1\text{O}_2]$ ). Entretanto, o  $^{18}[^1\text{O}_2]$  recém formado tem a capacidade de transferir parte de sua energia para o  $\text{O}_2$  molecular presente no meio. Se a transferência de energia ocorrer antes da reação com a dGuo, haverá  $^1\text{O}_2$  disponível para a mesma reação e, desta forma, será formada não apenas  $[^{18}\text{O}]$  8-oxodGuo, mas também 8-oxodGuo (MARTINEZ *et al.*, 2004). Não há como precisar a quantidade de transferência de energia do  $^1\text{O}_2$  ao  $\text{O}_2$ . Por isso, os resultados aqui apresentados estão em termos de porcentagem do controle, o qual era composto apenas por dGuo e  $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$  em solução de água deuterada após 5 min de reação.

O estudo cinético mostra que as porcentagens de 8-oxodGuo e de  $[^{18}\text{O}]$  8-oxodGuo aumentam após a adição de GSH (FIGURA 11B), e este aumento é de até 2,5 vezes para a  $[^{18}\text{O}]$  8-oxodGuo. Após a adição de GSSG, a geração de 8-oxodGuo foi muito parecida com a do controle, enquanto a de  $[^{18}\text{O}]$  8-oxodGuo aumentou em uma cinética muito similar àquela da adição de GSH.

A detecção e quantificação de  $[^{18}\text{O}]$  dSp também foi realizada mas, neste caso, apenas no tempo de incubação de 2,5 h. Seu resultado mostrou que tanto a GSH quanto a GSSG nas concentrações 5 mmol/L zeraram o conteúdo de  $[^{18}\text{O}]$  dSp após 2,5 h de incubação, o que está de acordo com os dados obtidos anteriormente sem a espécie oxidante isotopicamente marcada (PERES, 2012; PERES *et al.*,

2015). Contudo, como neste caso o gráfico correspondente não possui valores acima de zero, o mesmo não foi mostrado.

**FIGURA 11: PORCENTAGEM DE 8-OXOdGUO E [ $^{18}\text{O}$ ] 8-OXOdGUO APÓS ADIÇÃO DE GSH OU GSSG.**



FONTE: Reproduzida de Peres *et al.* (2015) com a permissão de Elsevier Copyright © 2015.

NOTA: Incubação e detecção conforme itens 4.5 e 4.6 da seção de Material e Métodos. A 8-oxodGuo possui uma  $m/z$  de 284 e [ $^{18}\text{O}$ ] 8-oxodGuo uma  $m/z$  de 286, pois a única diferença entre elas é uma molécula de  $^{18}\text{O}$  ao invés de outra de  $^{16}\text{O}$ . Os resultados estão apresentados como porcentagem do controle composto de dGuo 1 mmol/L e DHPN $^{18}\text{O}_2$  5 mmol/L em água deuterada após 5 min de reação.

LEGENDA: A) Porcentagem de 8-oxodGuo. B) Porcentagem de [ $^{18}\text{O}$ ] 8-oxodGuo.

## 5.2 Síntese de 8-oxodGuo

Com o intuito de obter 8-oxodGuo em quantidade suficiente para realizar experimentos de incubação de 8-oxodGuo 1 mmol/L, DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L e GSH ou GSSG 1 ou 5 mmol/L, foi desenvolvida uma metodologia própria de síntese deste nucleosídeo modificado. Inicialmente foi feita uma vasta revisão de literatura a respeito e um sumário deste estudo pode ser visualizado na TABELA 4. A partir desta revisão, duas reações foram escolhidas como reações padrão para os testes seguintes. Estas reações foram denominadas I e II (vide item 4.3.3 da seção Material e Métodos) e foram realizadas como originalmente descritas (KASAI; NISHIMURA, 1984; SINGH *et al.*, 2003). Com base nestas, foram realizadas as reações III, IV, V e VI. Destas, as duas primeiras tinham ferro como íon oxidante e as duas últimas, cobre. Após injeção em HPLC sob um fluxo isocrático de 0,2 mL/min em metanol 15% (condição I), a formação de 8-oxodGuo só foi observada nas amostras contendo CuSO<sub>4</sub> (reações V e VI). A reação VI foi a escolhida para os próximos passos, pois a mesma não envolvia borbulho de O<sub>2</sub> e por isso era mais fácil de ser realizada.

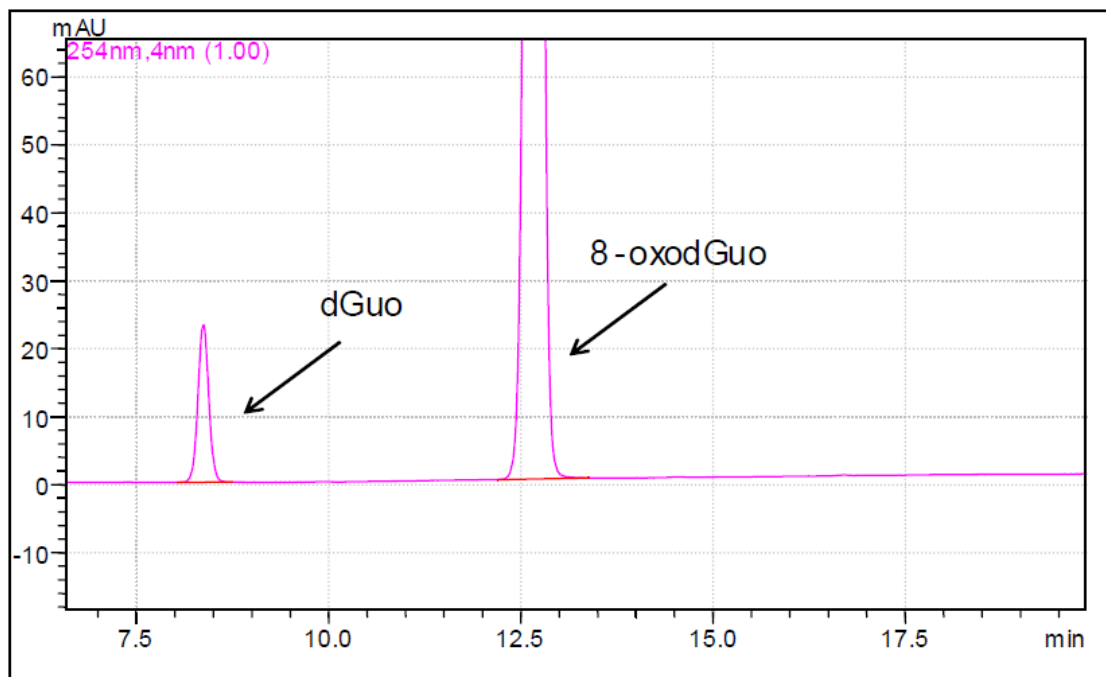
Visando obter uma melhor resolução entre dGuo remanescente da reação e a 8-oxodGuo recém sintetizada e, desta forma, otimizar o processo de coleta de 8-oxodGuo, o fluxo isocrático de metanol 15% (condição I), foi modificado para um gradiente composto de ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B) como segue: 0 – 20 min, 5% B; 20 min, 15% B; 25 min, 20% B e 30 min, 5% B (condição II). Como esperado, esta mudança foi suficiente para separar melhor a dGuo da 8-oxodGuo. A reação VI foi então reanalisada utilizando este novo gradiente de fase móvel (condição II) conforme pode ser visualizado na FIGURA 12. Em seguida, a 8-oxodGuo foi coletada, liofilizada e armazenada em temperatura de -20°C.

TABELA 4 – REAÇÕES DE OXIDAÇÃO DA dGUO

FONTE: O autor (2016).

AUTORES	SUBSTRATO	ÁCIDO ASCÓRBICO	EDTA	FONTE DE COBRE	FONTE DE FERRO	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	pH	TEMPERATURA	TEMPO
(BRODIE <i>et al.</i> , 1953) *	6 mmol/L (diversas)	14 mmol/L	6,5 mmol/L	-	1,3 mmol/L	-	6,7	37°C	2h
(KASAI; NISHIMURA, 1984)	dGuo 2,5 mmol/L	14 mmol/L	6,5 mmol/L	-	1,3 mmol/L	50 mmol/L	6,8	37°C	3h
(ARUOMA <i>et al.</i> , 1991)	DNA 0,5 mg/mL	100 µmol/L	100 µmol/L	25 µmol/L	25 µmol/L	2,8 mmol/L	7,4	37°C	1h
(LLOYD; PHILLIPS, 1999)	DNA 0,5 mg/mL	-	0 a 5 mmol/L	250 µmol/L	-	50 mmol/L	-	37°C	1h
(YOSHINO <i>et al.</i> , 1999)	DNA 100 µg	0,2 mmol/L	-	0,2 mmol/L	-	-	7,4	37°C	1h
(SINGH <i>et al.</i> , 2003)	dGuo 1 mg/mL	10 mmol/L	-	1,2 mmol/L	-	5%	-	ambiente	15 min
(MUCHA <i>et al.</i> , 2006)	DNA 25 µg/mL	-	-	50 µmol/L ou 5mmol/L	-	500 µmol/L ou 50 mmol/L	7,4	37 °C	1h ou 90 min
(CERCHIARO <i>et al.</i> , 2009)	GTP 1mmol/L	1mmol/L	-	10 µmol/L	-	-	7,4	37°C	4h
(FLEMING <i>et al.</i> , 2011)	dGuo 2 mmol/L	2 mmol/L	10 mmol/L	1 mmol/L	-	10 mmol/L	7,0	22°C	1h
(SPENCER <i>et al.</i> , 2011)	DNA 300 µg/mL	150 µmol/L	-	30 µmol/L	-	-	7,4	37 °C	4h
(BERGSTRÖM <i>et al.</i> , 2012)	dGuo 400 µmol/L	-	-	10 µmol/L	-	200 µmol/L	5,3	37°C	1h

**FIGURA 12 - CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DE dGUO E DE 8-OXOdGUO NA CONDIÇÃO DE SEPARAÇÃO II**



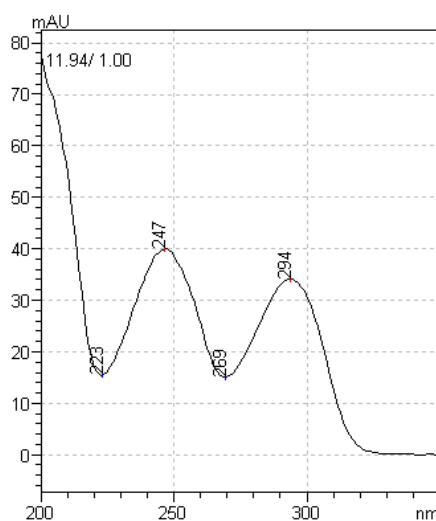
FONTE: O autor (2016).

NOTA: Cromatograma da injeção de 20 µL de padrões comerciais de dGuo 2,5 mmol/L e 8-oxodGuo 1 mmol/L usando a condição de separação II (gradiente de ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B) como segue: 0 – 20 min, 5% B; 20 min, 15% B; 25 min, 20% B e 30 min, 5% B. A distância entre as substâncias favorece a coleta de 8-oxodGuo.

Contudo, foi observado que a 8-oxodGuo, enquanto na solução de reação, degradava-se com facilidade, possivelmente por causa da presença de íons  $\text{Cu}^{2+}$  em solução. Ela poderia estar sendo re-oxidada a outros produtos. Então, planejando remover o máximo possível de  $\text{Cu}^{2+}$  em solução após a reação, foi adicionada uma fase de pré-purificação ao processo, usando uma coluna C18 Bond Elut de 500 mg com 3 mL de capacidade, conforme descrito no item 4.3.2 da seção de Material e Métodos.

A etapa de pré-purificação se mostrou bastante eficiente em manter estável a quantidade de 8-oxodGuo sintetizada e foi incorporada ao processo de síntese de modo que, deste momento em diante, todas as reações realizadas passaram por este processo. A síntese de 8-oxodGuo foi confirmada pelo seu espectro UV em 254 nm em HPLC (FIGURA 13) e por sua  $m/z$  de 284 e 168 (a segunda  $m/z$  indica a perda da ribose) por espectrometria de massas (FIGURA 14).

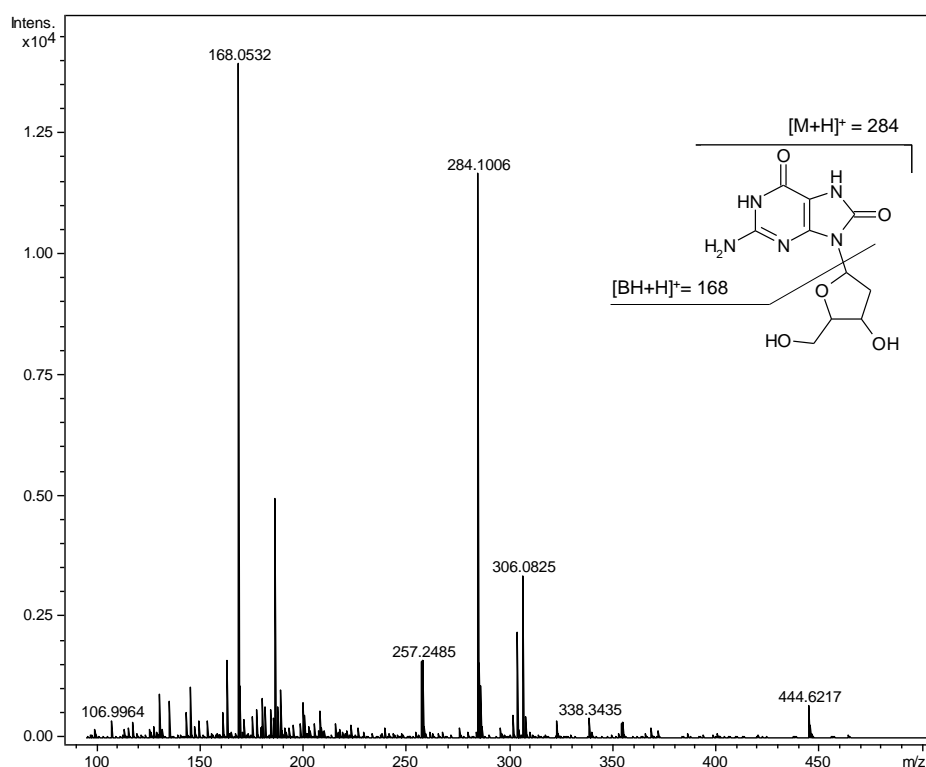
**FIGURA 13 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA 8-OXodGUO EM 254 nm**



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil de escaneamento por detecção de arranjo de diodo de padrão de 8-oxodGuo 1 mmol/L em HPLC usando a condição de separação II (gradiente de ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B) como segue: 0 – 20 min, 5% B; 20 min, 15% B; 25 min, 20% B e 30 min, 5% B.

**FIGURA 14 - DETECÇÃO DE 8-OXodGUO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

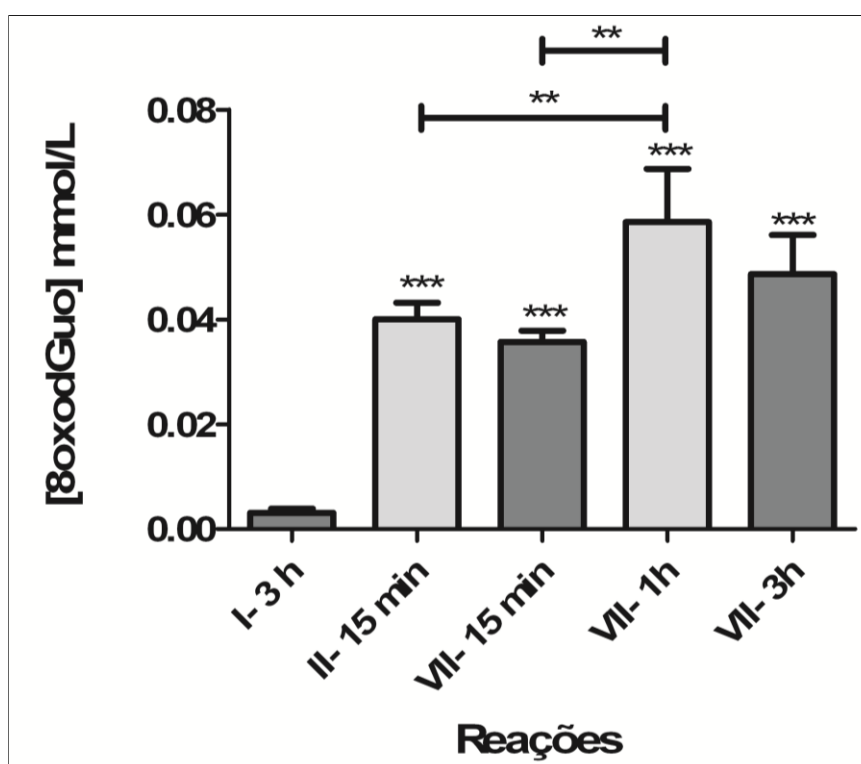


FONTE: O autor (2016).

NOTA: Perfil de escaneamento completo MS de 8-oxodGuo sintetizada pela reação VIII em aparelho micrOTOF II no modo positivo, conforme item 4.3.3 da seção de Material e Métodos. As *m/z* de 284 e 168 representam a 8-oxodGuo, sendo 168 a *m/z* com perda da ribose.

Para avaliar se a ausência de EDTA aumentaria o rendimento final de 8-oxodGuo, a reação VI foi realizada sem este componente e produziu mais 8-oxodGuo. A reação foi então modificada para ser realizada sem EDTA, com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% v/v e com uma quantidade maior de ácido ascórbico (140 mmol/L) e, neste caso, foi referida como reação VII. Estas modificações aumentaram o rendimento final de síntese, como pode ser observado na FIGURA 15, que compara as reações padrão I e II em seus respectivos tempos de incubação de 3h e 15 min, com a reação VII em diferentes tempos de incubação: 15 min, 1h e 3h.

**FIGURA 15 - REAÇÃO VII REALIZADA EM DIFERENTES TEMPOS E SUA COMPARAÇÃO COM AS REAÇÕES PADRÃO I E II**



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Reações padrão I e II e reação VII realizadas em diferentes tempos de incubação, conforme item 4.3 da seção de Material e Métodos. O meio da reação I era composto de dGuo 2,5 mmol/L, ácido ascórbico 14 mmol/L, EDTA 6,5 mmol/L, FeSO<sub>4</sub> 1,3 mmol/L e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mmol/L em PBS. O meio da reação II era composto de dGuo 3,7 mmol/L, ácido ascórbico 10 mmol/L, CuSO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% v/v. O meio da reação VII era composto de dGuo 2,5 mmol/L, ácido ascórbico 140 mmol/L, CuSO<sub>4</sub> 1,3 mmol/L e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% v/v. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes em duplicata e a estatística foi realizada em relação à reação I.

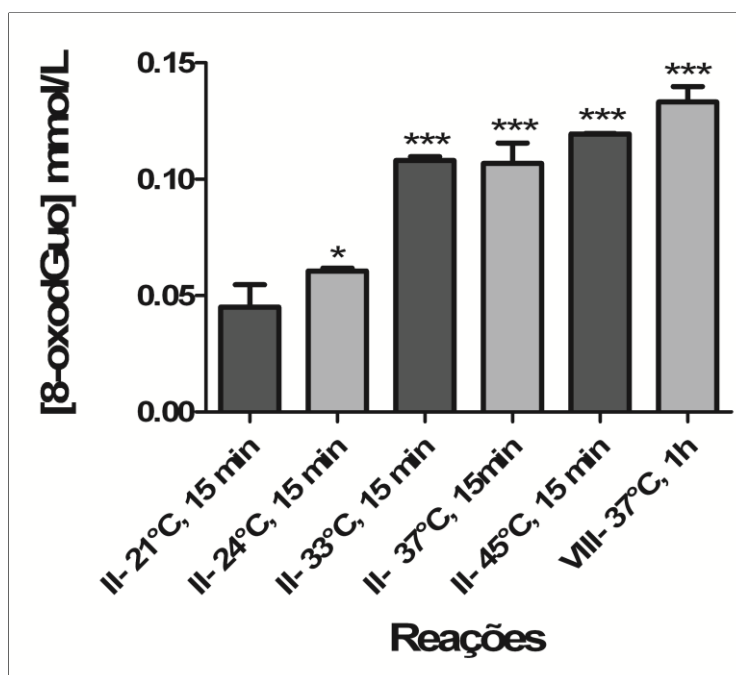
Não houve diferença entre os tempos de 1h e 3h de incubação da reação VII (em 37°C sob agitação branda), mas ambos os tempos proporcionaram um rendimento superior ao tempo de 15 min (FIGURA 15). Visando uma reação de



síntese em menor tempo possível, o tempo de 1h foi então escolhido para ser carregado para as outras etapas do processo de melhora da síntese de 8-oxodGuo.

É bastante claro que a reação VII resulta em 8-oxodGuo mais eficientemente que a reação padrão I, pois ambas são iniciadas com dGuo 2,5 mmol/L. Para que a reação VII pudesse ser diretamente comparada com a reação II, ela foi modificada para partir de dGuo 3,7 mmol/L e, neste caso, passou a ser denominada como reação VIII. Foi então realizado um estudo cinético de temperatura da reação II nas temperaturas de 21°C, 24°C, 33°C 37 °C e 45°C e os resultados foram comparados com aquele da reação VIII (FIGURA 16). Estes resultados mostram que a síntese de 8-oxodGuo pela reação II é temperatura-dependente e que aumenta até 45°C (FIGURA 16) mas diminui em temperaturas superiores. Então, usando seu tempo original de 15 min, a temperatura de 45°C mostrou-se como a mais eficiente em sintetizar 8-oxodGuo (FIGURA 16).

**FIGURA 16 - CINÉTICA DA REAÇÃO II E SUA COMPARAÇÃO COM A REAÇÃO VIII A 37°C**

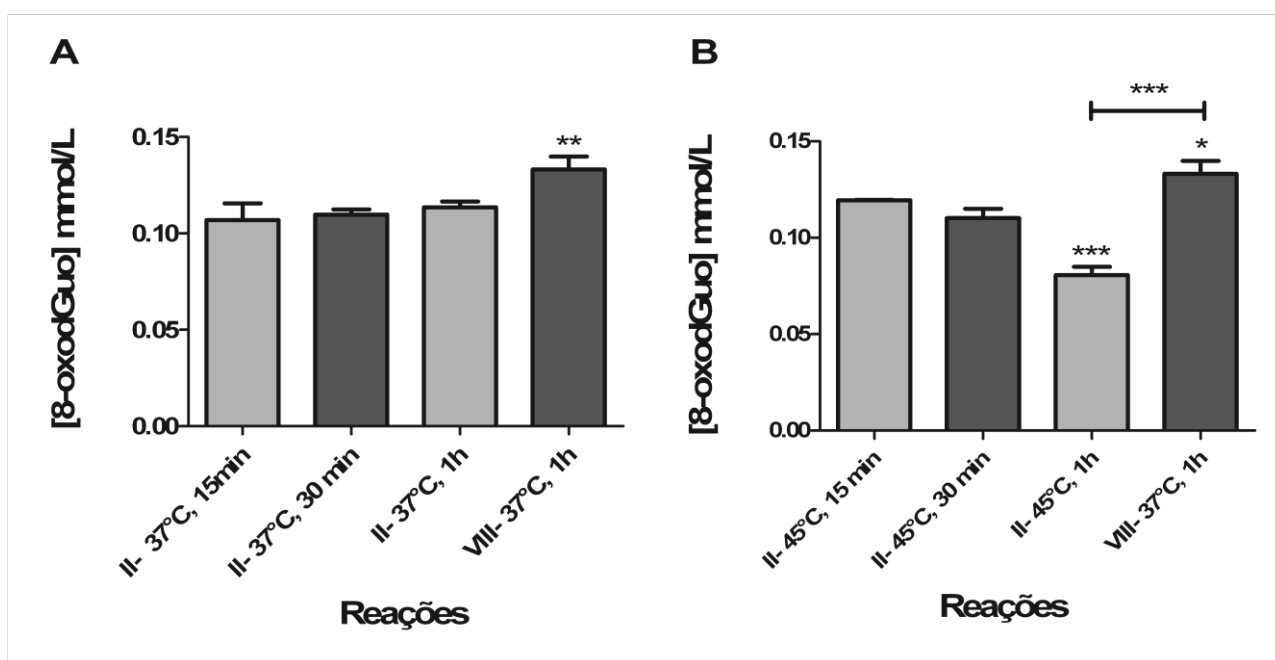


FONTE: O autor (2016).

NOTA: A reação padrão II foi realizada em diferentes temperaturas por 15 min e a reação VIII foi realizada a 37°C por 1h. Incubação e detecção conforme descrito nos item 4.3 da seção de Material e Métodos. O meio de reação II era composto de dGuo 3,7 mmol/L, ácido ascórbico 10 mmol/L, CuSO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% v/v. O meio de reação VIII era composto de dGuo 3,7 mmol/L, ácido ascórbico 140 mmol/L, CuSO<sub>4</sub> 1,3 mmol/L e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% v/v. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes em duplicata e a estatística foi realizada em relação à reação II a 21°C.

A formação de 8-oxodGuo pela reação II também poderia ser tempo dependente. Para avaliar esta possibilidade, a reação II nas temperaturas de 37°C (FIGURA 17A) e de 45°C (FIGURA 17B) foram incubadas não apenas pelo seu tempo original de 15 min, mas também por 30 min e por 1h. Embora possam ser percebidas pequenas variações entre os grupos, a reação II mais eficiente em produzir 8-oxodGuo foi aquela realizada no tempo original de 15 min e a 45°C. Contudo, a reação VIII foi ainda mais eficiente (FIGURA 17).

**FIGURA 17 - ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO II A 37°C E A 45°C**



FONTE: O autor (2016).

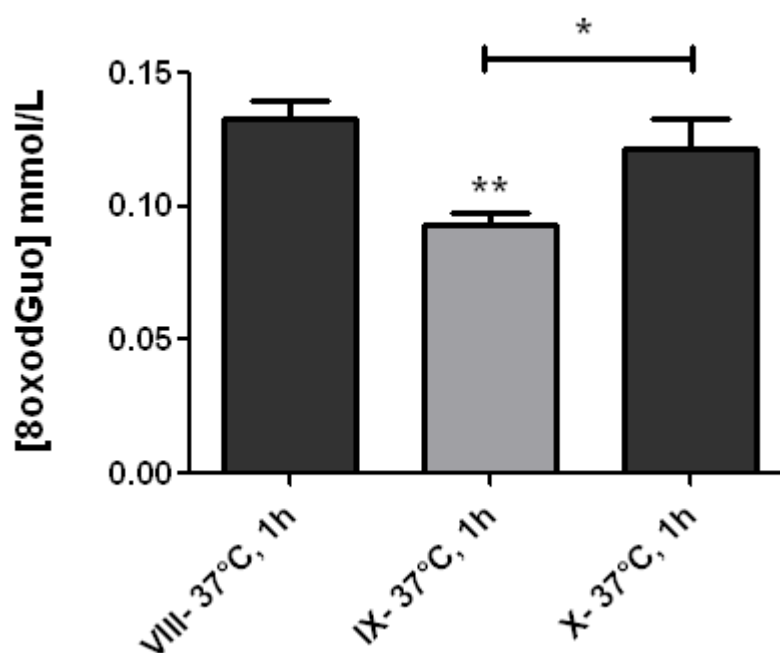
NOTA: Incubação e detecção conforme descrito no item 4.3 da seção de Material e Métodos. O meio de reação II era composto de dGuo 3,7 mmol/L, ácido ascórbico 10 mmol/L, CuSO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% v/v. O meio de reação VIII era composto de dGuo 3,7 mmol/L, ácido ascórbico 140 mmol/L, CuSO<sub>4</sub> 1,3 mmol/L e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% v/v. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes em duplicata. Em A, a estatística foi realizada em relação à reação II a 37°C por 15 min e, em B, em relação à reação II a 45°C por 15 min.

LEGENDA: A) Estudo cinético da reação II a 37°C. B) Estudo cinético da reação II a 45°C.

Na reação VIII, o íon Cu<sup>2+</sup> é essencial para a oxidação da dGuo, assim como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois eles reagem para gerar as espécies que efetivamente reagem com a dGuo para produzir 8-oxodGuo (STOEWE; PRÜTZ, 1987). Então, seria interessante avaliar se uma mudança na concentração de um destes componentes em solução afetaria a geração de 8-oxodGuo. Visando este tipo de análise, a reação VII foi

então incubada com  $\text{CuSO}_4$  10 mmol/L, uma concentração muito maior que os 1,3 mmol/L originais e, neste caso, foi denominada de reação IX. Como pode ser observado na FIGURA 18, esta alteração resultou em menor produção de 8-oxodGuo. O próximo passo foi avaliar o papel da  $\text{H}_2\text{O}_2$  na reação VIII, dobrando sua concentração original de 5% v/v para 10% v/v, gerando a reação X. A FIGURA 18 mostra que esta modificação não teve efeito sobre a síntese de 8-oxodGuo. Assim, visando uma síntese de 8-oxodGuo que fosse a mais eficiente e mais simples possível, foi escolhida a reação VIII incubada a  $37^\circ$  por 1 h, cuja composição era dGuo 3,7 mmol/L, ácido ascórbico 140 mmol/L,  $\text{CuSO}_4$  1,3 mmol/L e  $\text{H}_2\text{O}_2$  5% v/v.

**FIGURA 18 - COMPARAÇÃO ENTRE AS REAÇÕES VIII, IX E X**



FONTE: O autor (2016).

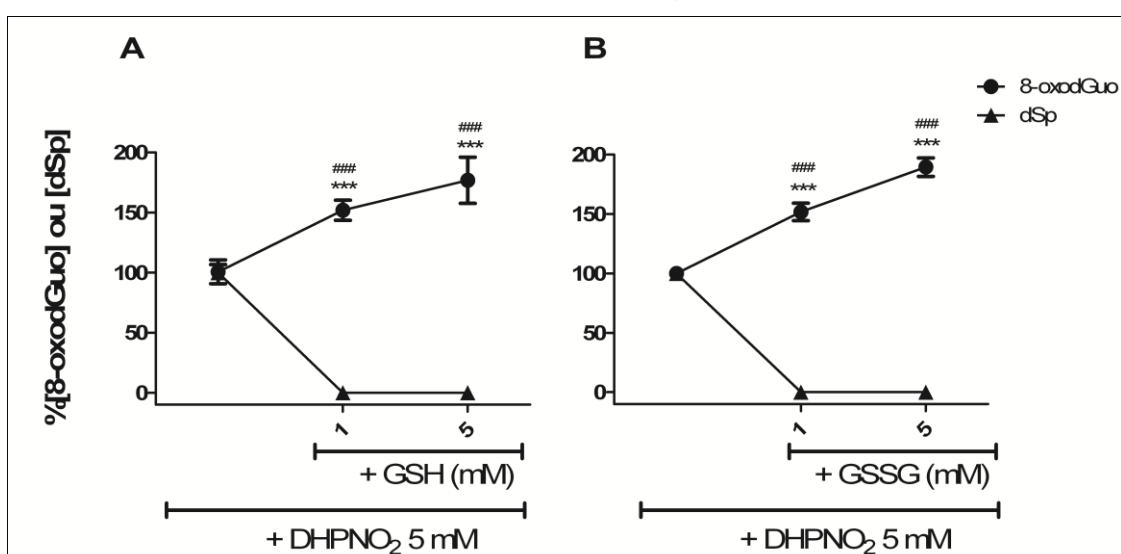
NOTA: Incubação e detecção conforme descrito no item 4.3 da seção de Material e Métodos. O meio de reação VIII era composto de dGuo 3,7 mmol/L, ácido ascórbico 140 mmol/L,  $\text{CuSO}_4$  1,3 mmol/L e  $\text{H}_2\text{O}_2$  5% v/v. O meio de reação IX era composto de dGuo 3,7 mmol/L, ácido ascórbico 140 mmol/L,  $\text{CuSO}_4$  10 mmol/L e  $\text{H}_2\text{O}_2$  5% v/v. O meio de reação X era composto de dGuo 3,7 mmol/L, ácido ascórbico 140 mmol/L,  $\text{CuSO}_4$  1,3 mmol/L e  $\text{H}_2\text{O}_2$  10% v/v. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em duplicata e a estatística foi realizada em relação à reação VIII.

### 5.3 Efeito da GSH ou da GSSG nos produtos da oxidação da 8-oxodGuo por $^1\text{O}_2$ em $\text{D}_2\text{O}$

Também foram realizadas incubações de 8-oxodGuo, DHPNO<sub>2</sub> e GSH ou GSSG. Neste caso, foram avaliados o consumo de 8-oxodGuo e a geração de dSp. Conforme pode ser observado na FIGURA 19, a adição de GSH (FIGURA 19A) ou de GSSG (FIGURA 19B) promoveu um comportamento muito semelhante, já que nos dois casos a formação de dSp foi suprimida. O fato de haver uma concentração maior de 8-oxodGuo após a adição de GSH ou de GSSG mostra claramente que o consumo de 8-oxodGuo foi parcialmente prevenido pela adição dos tióis.

Após incubação com DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L, a concentração inicial de 1 mmol/L de 8-oxodGuo foi reduzida a  $0,31 \pm 0,02$  mmol/L. Porém, em presença de GSH 5 mmol/L, esta concentração residual aumentou para 0,53 mmol/L de 8-oxodGuo e, em presença de GSSG 5 mmol/L, para cerca de 0,59 mmol/L.

FIGURA 19 - EFEITO DA GSH E DA GSSG NA OXIDAÇÃO DA 8-OXODGUO POR  $^1\text{O}_2$



FONTE: Reproduzida de Peres *et al.* (2015) com a permissão de Elsevier Copyright © 2015.

NOTA: Incubação e detecção conforme itens 4.3, 4.4 e 4.5 da seção de Material e Métodos. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata. A concentração de média de 8-oxodGuo considerada como 100% é de  $0,31 \pm 0,02$  mmol/L e a de dSp é de  $0,05 \pm 0,004$  mmol/L. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes do controle com  $p < 0,001$ . (####) Valores estatisticamente diferentes entre as curvas com  $p < 0,001$ .

LEGENDA: A) Adição de GSH. B) Adição de GSSG.

#### 5.4 Avaliação do conteúdo residual de GSH e GSSG nas amostras após incubação em D<sub>2</sub>O

O conteúdo residual de glutathiona foi avaliado nas amostras contendo dGuo ou 8-oxodGuo 1 mmol/L e DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L. Cada amostra teve as concentrações de GSH e GSSG determinadas após o período total de incubação (2,5h), independentemente se GSH ou GSSG estivessem originalmente em solução. Para tanto, foi desenvolvida uma metodologia própria em HPLC (item 4.6 da seção de Material e Métodos) e os resultados foram bem consistentes com a quantidade de tiol adicionada durante a incubação. Foram realizados controles com a adição de DHPN no lugar de DHPNO<sub>2</sub>, os quais confirmaram que o DHPN não teve efeito sobre a oxidação da GSH ou a redução da GSSG. Por exemplo, incubações contendo GSH 5 mmol/L e DHPN 5 mmol/L mostraram uma concentração final de GSH de  $4,79 \pm 0,34$  mmol/L e soluções contendo GSSG 5 mmol/L e DHPN 5 mmol/L mostraram uma concentração final de GSSG de  $4,62 \pm 0,27$  mmol/L.

Conforme pode ser observado na FIGURA 20A, amostras contendo GSH 1 mmol/L e DHPNO<sub>2</sub> mostraram uma concentração residual de GSH de  $0,09 \pm 0,02$  mmol/L e de GSSG de  $0,51 \pm 0,01$  mmol/L. Este resultado é consistente com a estequiometria, pois são necessárias duas moléculas de GSH para formar uma molécula de GSSG. A mesma incubação foi também realizada na presença de dGuo e, neste caso, foi observado um conteúdo residual de GSSG menor ( $0,37 \pm 0,01$  mmol/L) e quase nenhuma GSH (cerca de 0,02 mmol/L). Entretanto, nas incubações com GSH na concentração de 5 mmol/L, apenas 5% da quantia inicial de GSH foi convertida a GSSG (FIGURA 20B).

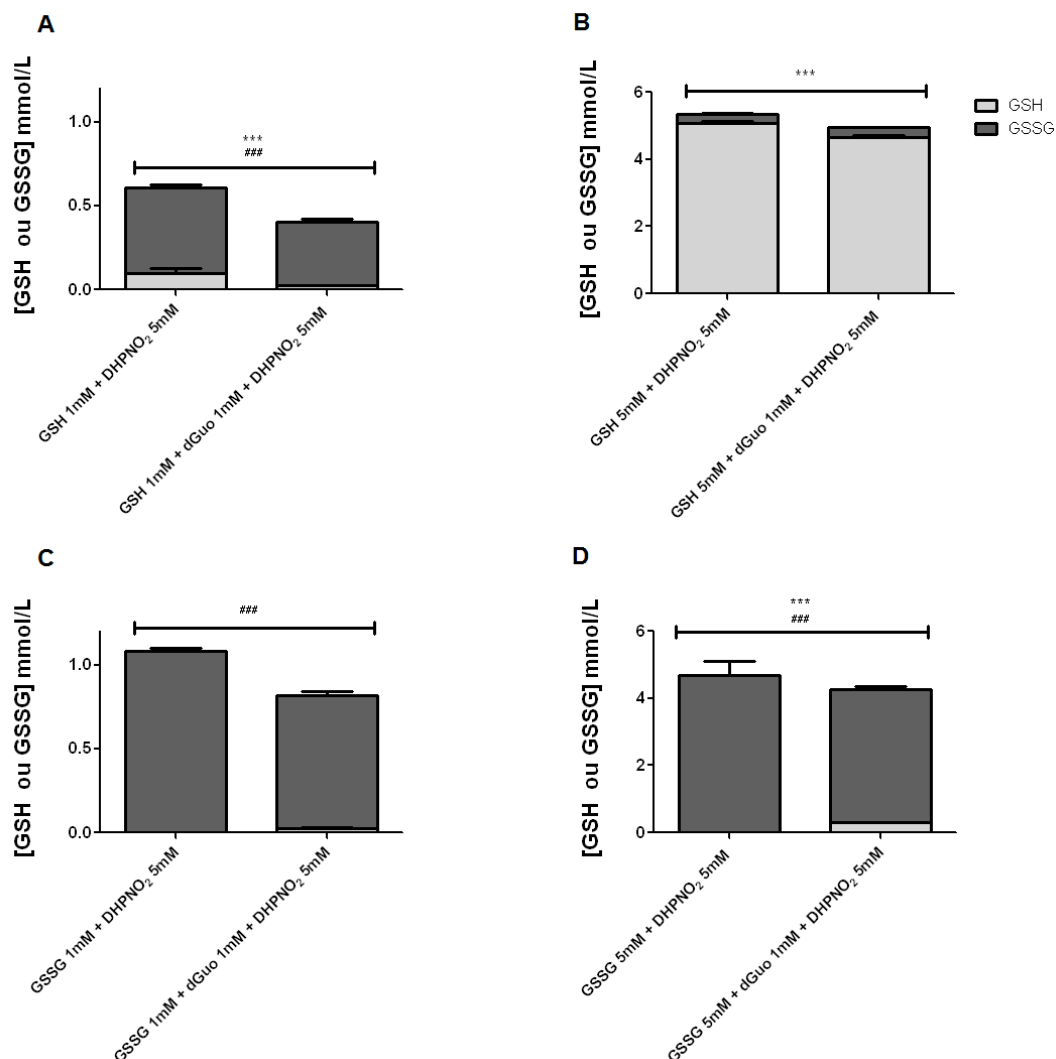
Comparando este último resultado com os 74% de oxidação de GSH a GSSG quando a dGuo foi adicionada às amostras com GSH 1 mmol/L, pode ser percebida uma influência na intensidade da oxidação pela quantidade de oxidante presente, ou seja, a GSH é muito mais susceptível à oxidação a GSSG quando há um excesso de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> em solução.

Quando as incubações foram realizadas na presença de GSSG 1 mmol/L e DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L, não foram observadas mudanças no conteúdo residual de glutathiona (FIGURA 20C). Interessantemente, a adição de dGuo 1 mmol/L a estas soluções promoveu uma diminuição na concentração de GSSG para  $0,79 \pm 0,02$

mmol/L. Foram observados resultados parecidos nas amostras contendo GSSG 5 mmol/L. Ou seja, o DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L não teve efeito na concentração de GSSG, mas a adição de dGuo 1 mmol/L foi capaz de diminuir a quantidade inicial de glutathiona oxidada de 5 mmol/L para  $3,96 \pm 0,10$  mmol/L (FIGURA 20D). É importante ressaltar que a dGuo promoveu exatos 79% de diminuição de GSSG em ambos os casos. Além disso, a dGuo também promoveu alguma conversão a GSH: cerca de 1,25% da GSSG 1 mmol/L foi convertida a GSH (0,025 mmol/L) e cerca de 2,9 % da GSSG 5 mmol/L foi convertida a GSH (0,29 mmol/L).

O conteúdo residual de GSH e de GSSG também foi analisado nas amostras incubadas com 8-oxodGuo ao invés de dGuo. Como pode ser observado na FIGURA 21A, a oxidação de GSH 1 mmol/L por <sup>1</sup>O<sub>2</sub> foi prevenida pela 8-oxodGuo, fato que não aconteceu com a dGuo (FIGURA 20A). Também pode ser visto que nas amostras contendo GSH 1 ou 5 mmol/L houve pouca conversão a GSSG (FIGURA 21A e B). Nas amostras contendo GSSG 1 ou 5 mmol/L, a 8-oxodGuo não promoveu a redução da GSSG a GSH (FIGURA 21C e D) contrariando o que aconteceu na presença de dGuo.

**FIGURA 20 - CONCENTRAÇÃO DE GSH E DE GSSG EM SOLUÇÕES CONTENDO dGUO, DHPNO<sub>2</sub> E GSH OU GSSG**

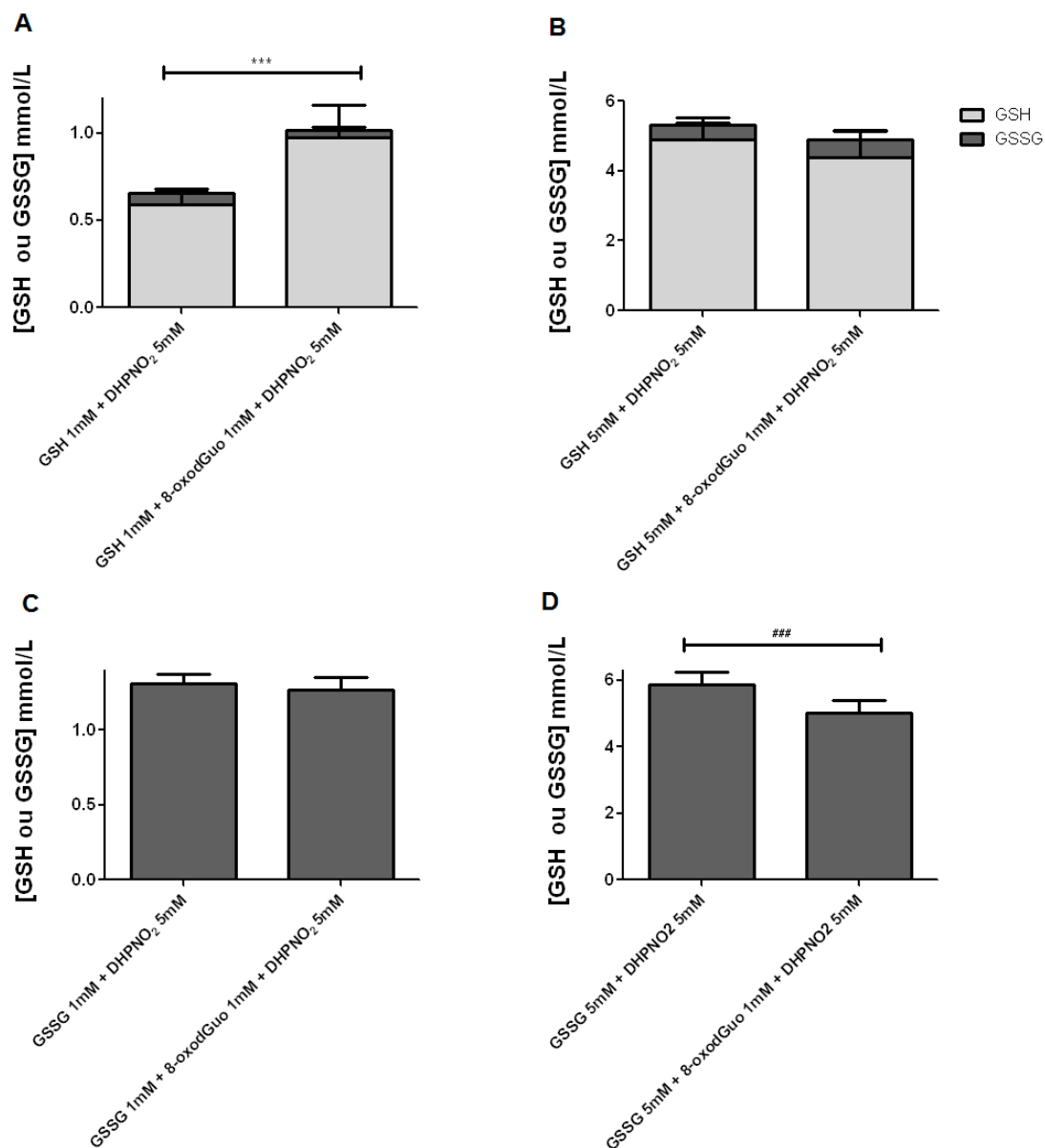


FONTE: Reproduzida de Peres *et al.* (2015) com a permissão de Elsevier Copyright © 2015.

NOTA: Incubação e detecção conforme itens 4.4 e 4.6 da seção de Material e Métodos. Os resultados representam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes entre o conteúdo GSH com  $p < 0.001$ . (###) Valores estatisticamente diferentes entre o conteúdo GSSG com  $p < 0.001$ .

LEGENDA: A) Soluções com presença de GSH 1 mmol/L. B) Soluções com presença de GSH 5 mmol/L. C) Soluções com presença de GSSG 1 mmol/L. D) Soluções com presença de GSSG 5 mmol/L.

**FIGURA 21 - CONCENTRAÇÃO DE GSH E DE GSSG EM SOLUÇÕES CONTENDO 8-OXOdGUO, DHPNO<sub>2</sub> E GSH OU GSSG**



FONTE: Reproduzida de Peres *et al.* (2015) com a permissão de Elsevier Copyright © 2015.

NOTA: Incubação e detecção conforme itens 4.4 e 4.6 da seção de Material e Métodos. Os resultados representam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes entre o conteúdo GSH com  $p < 0,001$ . (###) Valores estatisticamente diferentes entre o conteúdo GSSG com  $p < 0,001$ .

LEGENDA: A) Soluções com presença de GSH 1 mmol/L. B) Soluções com presença de GSH 5 mmol/L. C) Soluções com presença de GSSG 1 mmol/L. D) Soluções com presença de GSSG 5 mmol/L.

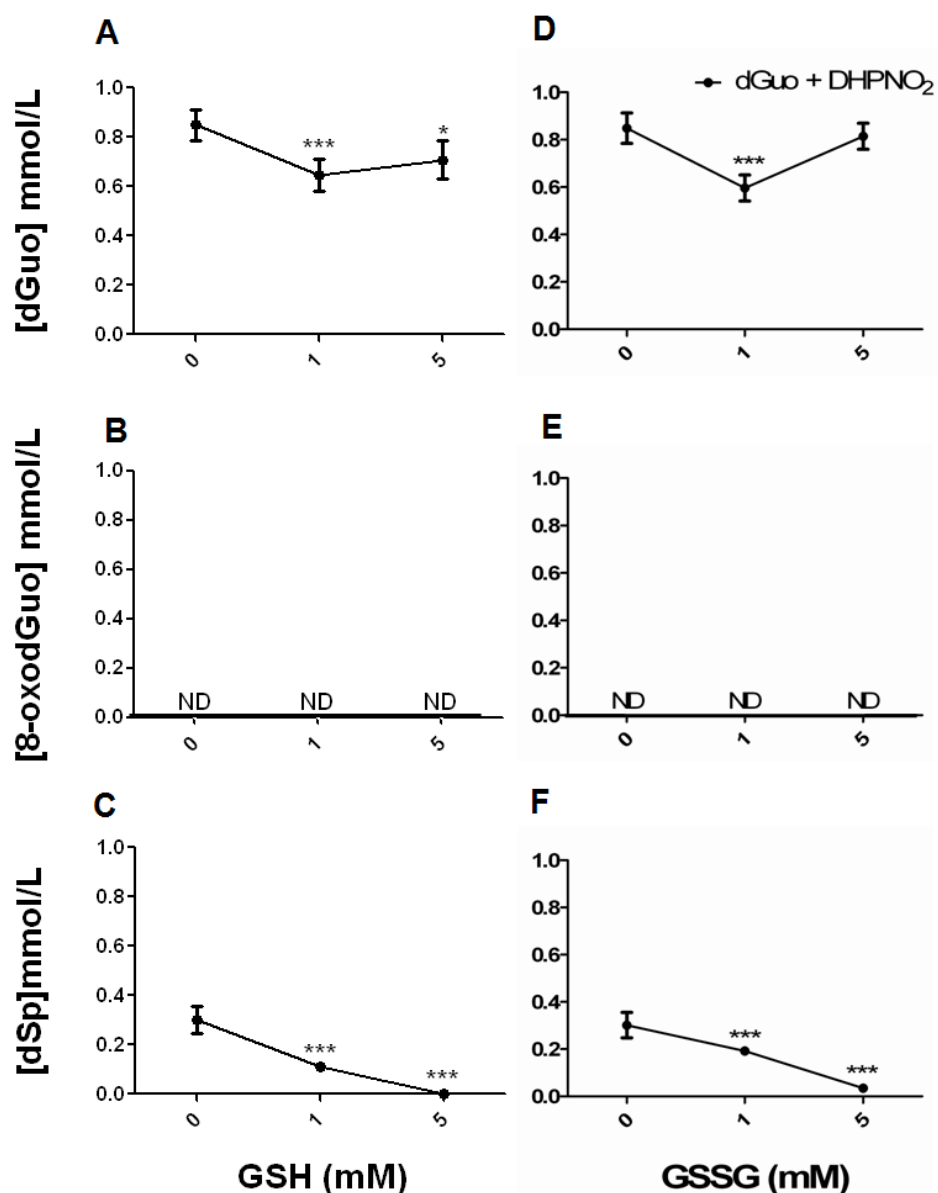


### 5.5 Avaliação da adição de GSH e GSSG na oxidação da dGuo por $^1\text{O}_2$ em $\text{D}_2\text{O}$ modificada para pD 9,0

Já foi mostrado que a geração de 8-oxodGuo pela oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  era dependente de pD e se anulava em pD 9,0 (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991b). Por esta razão, alguns experimentos foram também realizados em  $\text{D}_2\text{O}$  com pD modificado para atingir pD 9,0. É importante ressaltar que, nas incubações anteriores, somente em  $\text{D}_2\text{O}$ , o pD foi medido e era de 5,5 após as 2,5 h de incubação a 37°C.

Em pD 9,0, a adição de GSH (FIGURA 22A) ou GSSG (FIGURA 22D) não protegeu a oxidação da dGuo como havia sido observado em  $\text{D}_2\text{O}$  (PERES, 2012). Além disso, a oxidação da dGuo por  $\text{DHPNO}_2$  5 mmol/L não gerou 8-oxodGuo e a adição de GSH ou GSSG às soluções não alterou este resultado. Contudo, os níveis basais de dSp (sem a adição de glutatona) tiveram concentrações cerca de 50% maiores em pD 9,0 quando comparadas às concentrações em  $\text{D}_2\text{O}$  (PERES, 2012). A GSH foi capaz de diminuir os níveis de dSp e a concentração de 5 mmol/L foi além e anulou estes níveis, exatamente como observado nas soluções em  $\text{D}_2\text{O}$ . Já a GSSG 5 mmol/L em pD 9 reduziu os níveis de dSp para  $0,03 \pm 0,00$  mmol/L, sem levá-los a zero.

FIGURA 22 - EFEITO DA GSH OU GSSG NA OXIDAÇÃO DA dGUO EM pH 9,0.



FONTE: Reproduzida de Peres *et al.* (2015) com a permissão de Elsevier Copyright © 2015.

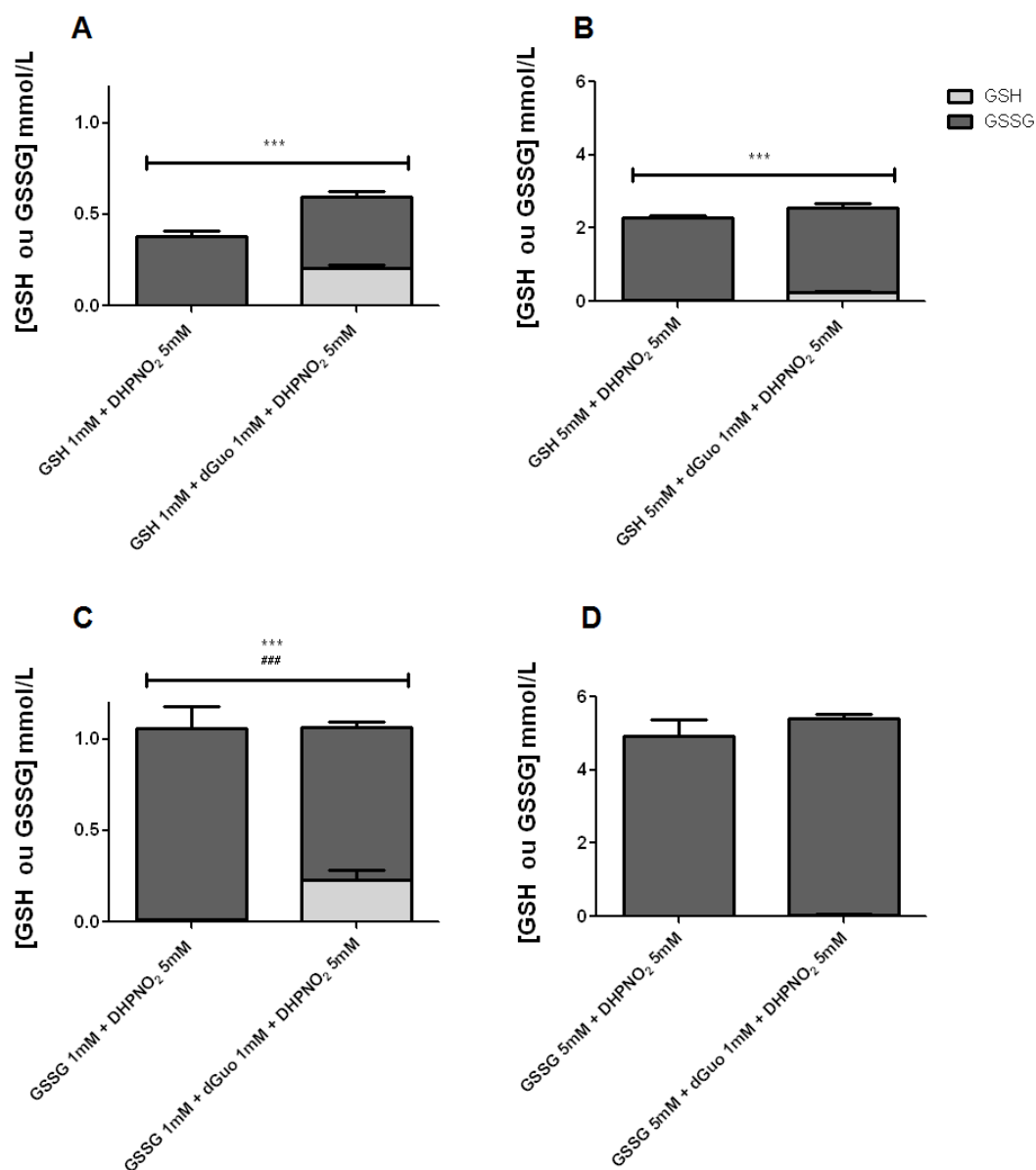
NOTA: Incubação e detecção conforme itens 4.4 e 4.5 da seção de Material e Métodos. Os resultados representam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes com  $p < 0,001$ .

LEGENDA: A) Níveis de dGuo em soluções com presença de GSH. B) Níveis de 8-oxodGuo em soluções com presença de GSH. C) Níveis de dSp em soluções com presença de GSH. D) Níveis de dGuo em soluções com presença de GSSG. E) Níveis de 8-oxodGuo em soluções com presença de GSSG. F) Níveis de dSp em soluções com presença de GSSG.

## 5.6 Avaliação do conteúdo residual de GSH e GSSG nas amostras após incubação em D<sub>2</sub>O modificada para pD 9,0

A medida da glutathiona residual nas amostras em D<sub>2</sub>O modificada para atingir pD 9,0 mostraram, novamente, que a adição de GSH 1 mmol/L em solução tem uma alta conversão a GSSG (FIGURA 23A). A adição de dGuo 1 mmol/L às amostras contendo GSH 1 mmol/L e DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L promoveu a proteção de cerca de  $0,23 \pm 0,03$  mmol/L da GSH inicialmente em solução (FIGURA 23A), mas este comportamento não refletiu na geração de 8-oxodGuo ou dSp (FIGURA 23B e FIGURA 23C). Os experimentos com GSH 5 mmol/L também mostraram bastante conversão a GSSG ( $0,378 \pm 0,03$  mmol/L), e embora esta concentração seja menor que os 5 mmol/L de GSH que foram adicionados em solução, ela é compatível como fato de que são necessárias duas moléculas de GSH para formar uma molécula de GSSG (FIGURA 23B). As amostras contendo GSSG 1 mmol/L (FIGURA 23C) ou 5 mmol/L (FIGURA 23D) não mostraram grandes mudanças no conteúdo de glutathiona. Houve apenas alguma redução da GSSG adicionada nas soluções contendo dGuo 1 mmol/L, DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L e GSSG 1 mmol/L (FIGURA 23D).

**FIGURA 23 - CONCENTRAÇÃO DE GSH E DE GSSG EM SOLUÇÕES CONTENDO dGUO, DHPNO<sub>2</sub> E GSH OU GSSG EM pH 9,0**



FONTE: Reproduzida de Peres *et al.* (2015) com a permissão de Elsevier Copyright © 2015.

NOTA: Incubação e detecção conforme itens 4.4 e 4.6 da seção de Material e Métodos. Os resultados representam média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes entre o conteúdo GSH com  $p < 0,001$ .(###) Valores estatisticamente diferentes entre o conteúdo GSSG com  $p < 0,001$ .

LEGENDA: A) Soluções com presença de GSH 1 mmol/L. B) Soluções com presença de GSH 5 mmol/L. C) Soluções com presença de GSSG 1 mmol/L. D) Soluções com presença de GSSG 5 mmol/L.

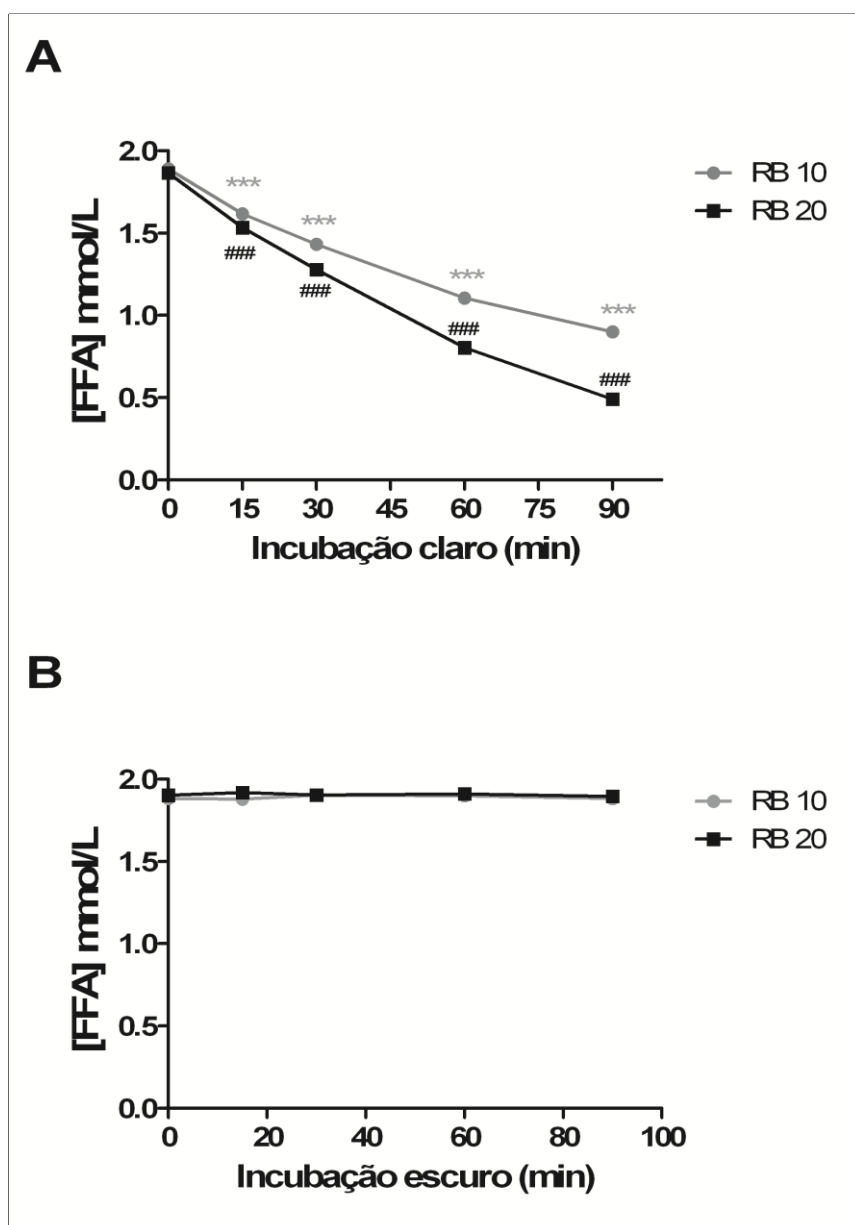
### 5.7 Geração de $^1\text{O}_2$ 3 mmol/L por fotossensibilização do rosa bengala

O  $^1\text{O}_2$  utilizado nos experimentos com nucleosídeos foi gerado pela decomposição térmica do DHPNO<sub>2</sub>. A concentração escolhida de endoperóxido foi a de 5 mmol/L que gera cerca de 60% de  $^1\text{O}_2$  puro (PIERLOT *et al.*, 2000), ou seja, 3 mmol/L. Na oxidação do DNA, foi utilizado  $^1\text{O}_2$  obtido através de fotossensibilização do tipo II como rosa bengala como sensibilizador. Para determinar qual seria a concentração de rosa bengala e o tempo de irradiação das amostras que gerasse  $^1\text{O}_2$  3 mmol/L, foi realizado um estudo prévio baseado no FFA consumido pelo  $^1\text{O}_2$  gerado. Para tanto, foram utilizadas duas concentrações de rosa bengala, 10 e 20  $\mu\text{mol/L}$ , e os tempos de irradiação de 15, 30, 60 e 90 min. Em cada caso, foram realizados dois experimentos concomitantemente: metade das amostras foi irradiada em câmara específica e foi denominada de incubação claro, e o restante foi protegido da luz e denominado de incubação escuro.

Como pode ser observado na FIGURA 24, houve apenas consumo de FFA nas amostras incubadas com rosa bengala 10 ou 20  $\mu\text{mol/L}$  e irradiadas (FIGURA 24A). Como esperado, nas amostras protegidas da luz, não ocorreu a reação de fotossensibilização que seria responsável para a geração de  $^1\text{O}_2$  e, como consequência direta disto, não houve consumo de FFA. De fato, os valores das amostras das incubações no escuro com rosa bengala 10 e 20  $\mu\text{mol/L}$  praticamente se sobrepuseram, reforçando que não houve reação (FIGURA 24B).

Para estimativa da quantidade de  $^1\text{O}_2$  formado pela irradiação, foi calculada a quantidade de FFA consumida nos diferentes tempos de incubação, tanto para as incubações com rosa bengala 10  $\mu\text{mol/L}$  (FIGURA 25A) quanto para as incubações com rosa bengala 20  $\mu\text{mol/L}$  (FIGURA 25 B). Considerando-se que foi empregada uma concentração de FFA próxima ao seu valor  $\beta$ , que é a concentração necessária de captador para reagir com 50 % do  $^1\text{O}_2$  presente (HAAG *et al.*, 1984), conclui-se que a quantidade de  $^1\text{O}_2$  formado é proporcional ao dobro da quantidade FFA consumido. Assim sendo, a incubação de rosa bengala 10  $\mu\text{mol/L}$  por 90 min geraria cerca de 2 mmol/L de  $^1\text{O}_2$  (FIGURA 25A) e a incubação de rosa bengala 20  $\mu\text{mol/L}$  por 90 min geraria cerca de 2,8 mmol/L de  $^1\text{O}_2$  (FIGURA 25B).

FIGURA 24 - CONCENTRAÇÃO DE FFA APÓS FOTOSSENSIBILIZAÇÃO COM ROSA BENGALA

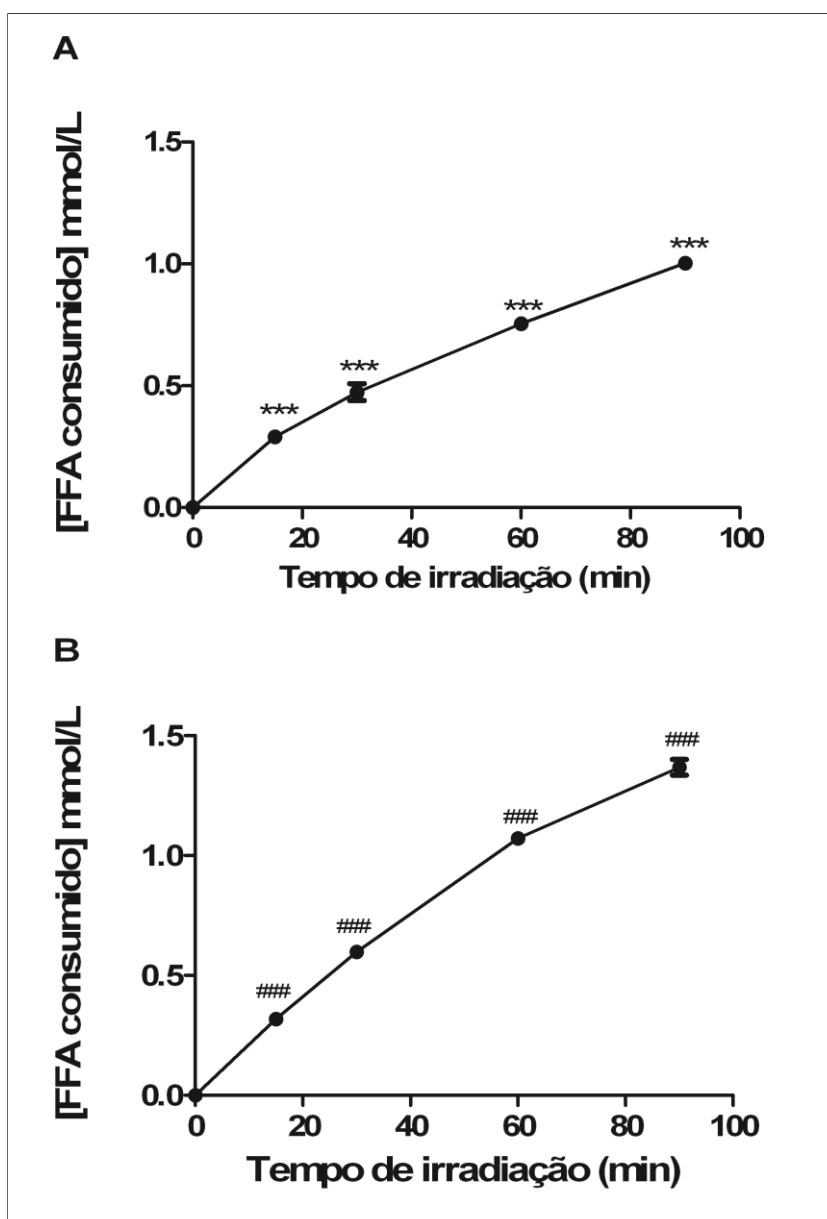


FONTE: O autor (2016).

NOTA: Incubação e detecção conforme item 4.7 da seção de Material e Métodos. Os dados representam dois experimentos independentes em triplicata. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes entre as amostras com rosa bengala (RB) 10  $\mu\text{mol/L}$  com  $p < 0,001$ . (###) Valores estatisticamente diferentes entre as amostras com rosa bengala (RB) 20  $\mu\text{mol/L}$  com  $p < 0,001$ .

LEGENDA: A) Incubação das amostras irradiadas (claro). B) Incubação das amostras protegidas da luz (escuro).

**FIGURA 25 - CONSUMO DE FFA NAS AMOSTRAS IRRADIADAS COM ROSA BENGALA 10 E 20  $\mu\text{MOL/L}$**



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Incubação e detecção conforme item 4.7 da seção de Material e Métodos. Os dados representam dois experimentos independentes em triplicata. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes entre as amostras com rosa bengala (RB) 10  $\mu\text{mol/L}$  com  $p < 0,001$ . (###) Valores estatisticamente diferentes entre as amostras com rosa bengala (RB) 20  $\mu\text{mol/L}$  com  $p < 0,001$ .

LEGENDA: A) Incubação das amostras irradiadas com rosa bengala 10  $\mu\text{mol/L}$ . B) Incubação das amostras irradiadas com rosa bengala 20  $\mu\text{mol/L}$ .

Como o propósito deste experimento era o de conseguir a geração de uma concentração de  $^1\text{O}_2$  de 3 mmol/L e a incubação de rosa bengala 20  $\mu\text{mol/L}$  foi a que mais se aproximou deste valor, esta incubação teve seus dados linearizados a uma equação do segundo grau (FIGURA 26), cuja equação que melhor se aproxima de sua curva é a equação (2).

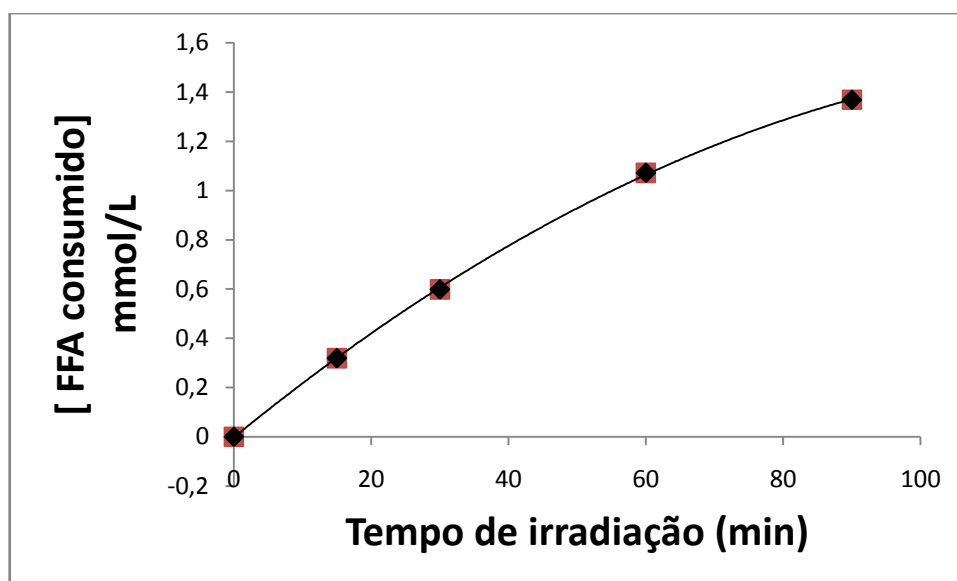
$$C = -0,000084t^2 + 0,022800t - 0,003196 \quad (2)$$

onde:

C= concentração de FFA consumido em mmol/L

t= tempo de irradiação em min

**FIGURA 26 - LINEARIZAÇÃO DOS DADOS DA IRRADIAÇÃO DE ROSA BENGALA 20  $\mu$ mol/L**



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Linearização dos dados da equação (2).

A partir da resolução da equação (2), para  $C = 1,5$  mmol/L de FFA, valor que se aproxima da geração de 3 mmol/L de  $^1\text{O}_2$ , chega-se a um valor de  $t = 113$  min. Então, padronizou-se o tempo de 115 min para a irradiação de DNA com rosa bengala 20  $\mu$ mol/L, pois estas condições foram as mais adequadas para gerar de  $^1\text{O}_2$  na concentração mínima de 3 mmol/L em solução.

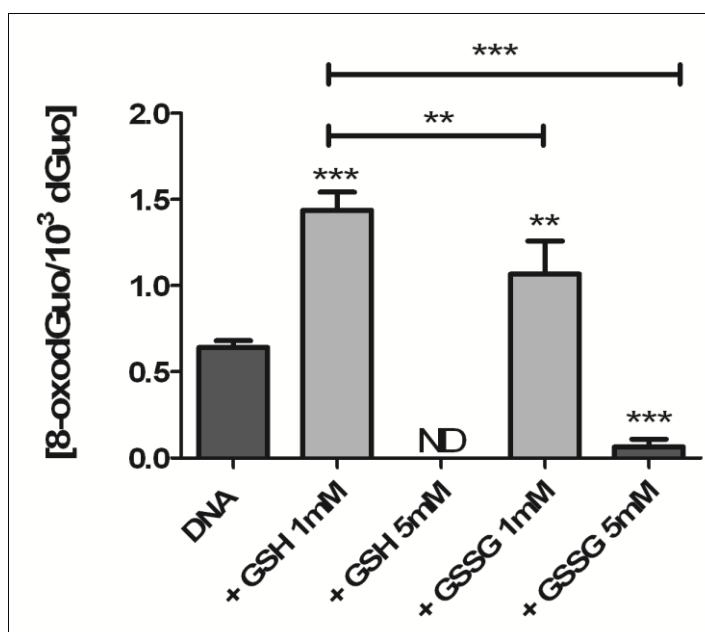
### 5.8 Efeito da GSH e da GSSG na oxidação de DNA de timo de bezerro em $\text{D}_2\text{O}$

Para verificar qual seria o efeito da GSH e da GSSG na oxidação do DNA por  $^1\text{O}_2$ , as amostras de DNA de timo de bezerro foram incubadas com ou sem GSH ou GSSG e rosa bengala e em seguida foram tratadas com nucleases e fosfatases,



de modo a serem separadas em nucleosídeos. Destes nucleosídeos, a dGuo e a 8-oxodGuo foram quantificadas por HPLC, pois o resultado da oxidação do DNA foi expressa em concentração de 8-oxodGuo por concentração de dGuo. Podemos observar pela FIGURA 27 que houve oxidação do DNA por  $^1\text{O}_2$ , gerando cerca de  $0,64 \pm 0,03$  de 8-oxodGuo por  $10^3$  de dGuo. Diferentemente do que aconteceu na oxidação do nucleosídeo livre dGuo, em DNA apenas a concentração de 1 mmol/L de GSH ou de GSSG foi capaz de aumentar estes valores, os quais chegaram a  $1,44 \pm 0,10$  com a adição de GSH e a  $1,07 \pm 0,19$  com a adição de GSSG. Curiosamente, a GSH 5 mmol/L protegeu em 100% a oxidação do DNA e a GSSG 5 mmol/L, em 90%. Também foram realizadas incubações sem irradiação (escuro), e sem a presença de rosa bengala. Em todos estes outros casos, a geração de 8-oxodGuo foi nula, confirmando que este produto só é formado na presença de  $^1\text{O}_2$  e que este só é produzido quando há reação de fotossensibilização do tipo II com rosa bengala.

**FIGURA 27 - EFEITO DA GSH E DA GSSG NA OXIDAÇÃO DE DNA POR  $^1\text{O}_2$**



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Incubação e detecção conforme itens 4.8 e 4.9 da seção de Material e Métodos. Brevemente, as amostras foram irradiadas por 115 min em câmara de irradiação específica para favorecer a fotossensibilização do tipo II. Em seguida, foi feita hidrólise do DNA e análise das concentrações de dGuo e 8-oxodGuo em HPLC. Os dados representam dois experimentos independentes em duplicata e a estatística foi realizada em relação ao grupo DNA, o qual era composto por DNA e rosa bengala e irradiado. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes entre com  $p < 0,001$ . Todos os demais grupos não revelaram produção de 8-oxodGuo. ND: não detectado

### 5.9 Avaliação do conteúdo residual de GSH e GSSG nas amostras de DNA de timo de bezerro incubadas em D<sub>2</sub>O

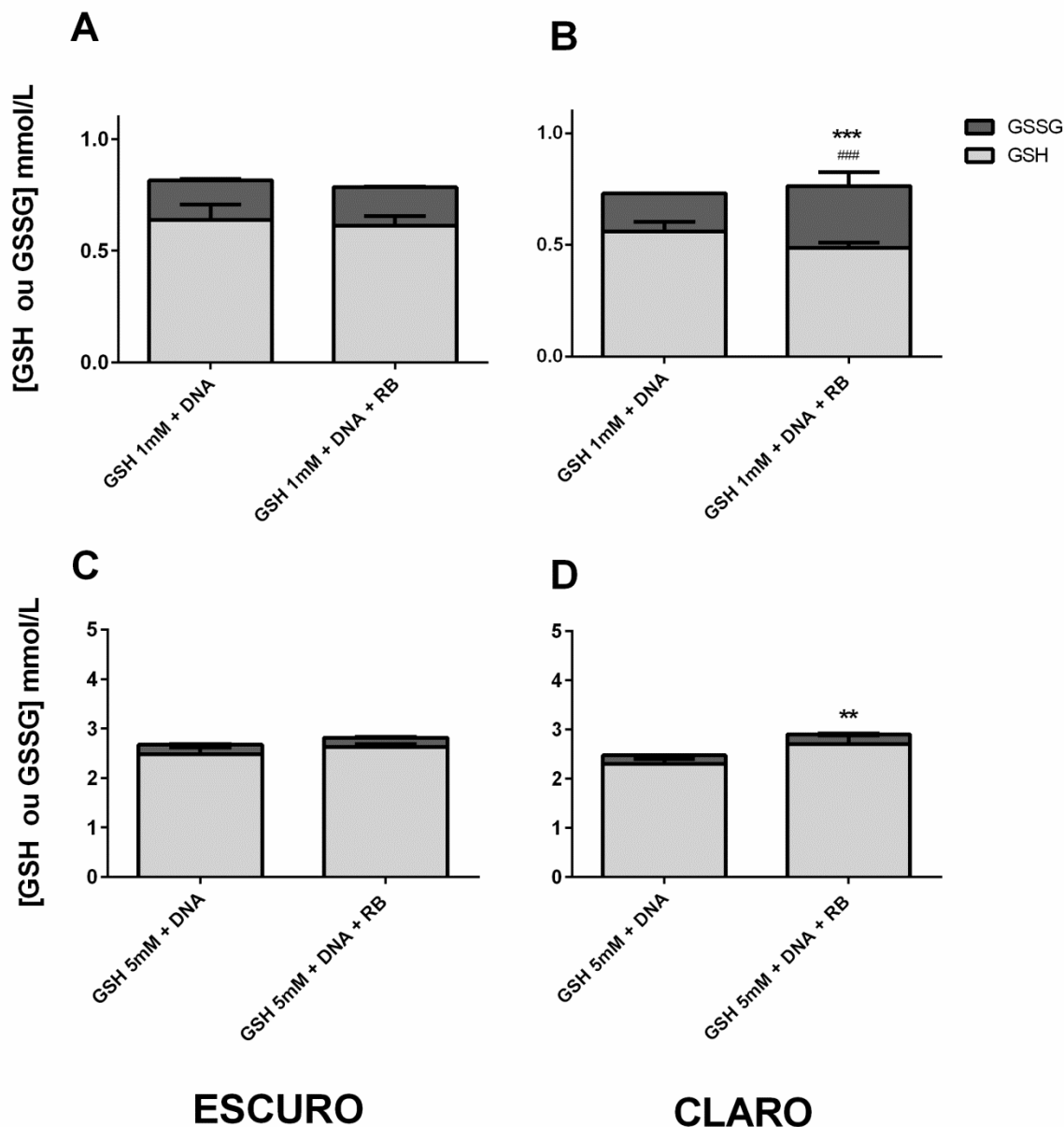
A medida da glutathiona residual nas amostras de DNA também foi quantificada nas amostras incubadas com GSH (FIGURA 28) e com GSSG (FIGURA 29). Nas amostras incubadas com GSH 1 mmol/L no escuro, não houve alteração no conteúdo de tiol e as concentrações de GSH foram de aproximadamente 0,62 mmol/L e as de GSSG foram cerca de 0,17 mmol/L (FIGURA 28A). A formação de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> resultante da fotossensibilização do rosa bengala nas amostras claro reduziu o conteúdo de GSH para  $0,48 \pm 0,04$  mmol/L e aumentou o de GSSG para  $0,22 \pm 0,01$  mmol/L (FIGURA 28B).

A GSH 5 mmol/L inicial das incubações escuro foi reduzida à concentração de  $2,47 \pm 0,13$  mmol/L na presença de DNA. A adição de rosa bengala a este sistema manteve a concentração de GSH estatisticamente igual à concentração anterior ( $2,62 \pm 0,05$  mmol/L), como mostra a FIGURA 28C. A irradiação destas amostras e consequente geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> nas incubações que continham rosa bengala mostraram alguma proteção na oxidação da GSH: a concentração de GSH na presença de DNA foi de  $2,29 \pm 0,10$  mmol/L na presença de DNA e este valor foi estatisticamente alterado para  $2,69 \pm 0,02$  mmol/L com a adição de rosa bengala (FIGURA 28D). Ainda assim, a concentração de GSSG permaneceu inalterada em todas as amostras incubadas com GSH 5 mmol/L (cerca de 0,2 mmol/L).

As incubações escuro com GSSG 1 mmol/L revelaram uma concentração de  $0,83 \pm 0,04$  mmol/L nas amostras com DNA e uma concentração de  $0,78 \pm 0,01$  mmol/L nas amostras com DNA e rosa bengala, valores que são estatisticamente iguais. A irradiação destas amostras também não alterou o conteúdo de GSSG, mostrando que, neste caso, o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> não teve efeito na glutathiona.

Nas amostras incubadas com GSSG 5 mmol/L, o conteúdo inicial do tiol dissulfeto foi modificado pela adição de DNA para  $3,18 \pm 0,15$  mmol/L nas amostras incubadas no escuro e  $2,84 \pm 0,16$  mmol/L nas amostras incubadas no claro. Já nas amostras contendo DNA e rosa bengala, a concentração de GSSG foi de  $3,15 \pm 0,12$  mmol/L nas incubações escuro e de  $2,76 \pm 0,28$  mmol/L nas incubações claro, indicando que o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> não alterou o conteúdo de GSH/GSSG do sistema (FIGURA 29C e D).

**FIGURA 28 - CONCENTRAÇÃO DE GSH E DE GSSG EM SOLUÇÕES CONTENDO DNA DE TIMO DE BEZERRO E GSH 1 OU 5 mmol/L**

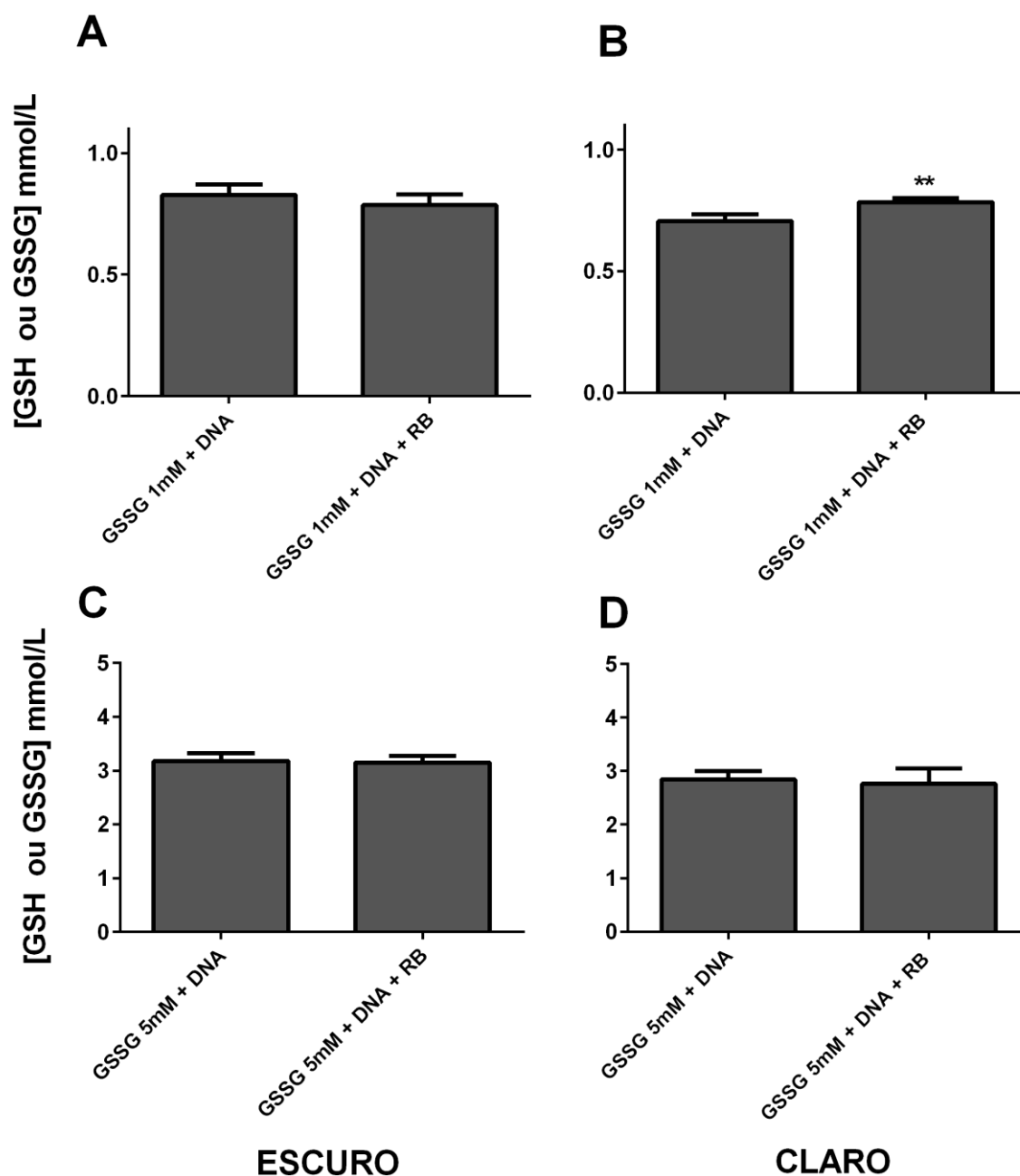


FONTE: O autor (2016).

NOTA: Incubação e detecção conforme itens 4.6, 4.8 e 4.10 da seção de Material e Métodos. Os resultados representam média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em duplicata. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes entre o conteúdo GSH com  $p < 0,001$ . (###) Valores estatisticamente diferentes entre o conteúdo GSSG com  $p < 0,001$ .

LEGENDA: A) Soluções escuro com presença de GSH 1 mmol/L. B) Soluções claro com presença de GSH 1 mmol/L. C) Soluções escuro com presença de GSH 5 mmol/L. D) Soluções claro com presença de GSH 5 mmol/L. RB: rosa bengala 20  $\mu$ mol/L.

**FIGURA 29 - CONCENTRAÇÃO DE GSH E DE GSSG EM SOLUÇÕES CONTENDO DNA DE TIMO DE BEZERRO E GSSG 1 OU 5 mmol/L**



FONTE: O autor (2016).

NOTA: Incubação e detecção conforme itens 4.6, 4.8 e 4.10 da seção de Material e Métodos. Os resultados representam média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes em duplicata. (\*\*\*) Valores estatisticamente diferentes entre o conteúdo GSH com  $p < 0,001$ . (###) Valores estatisticamente diferentes entre o conteúdo GSSG com  $p < 0,001$ .

LEGENDA: A) Soluções escuro com presença de GSSG 1 mmol/L. B) Soluções claro com presença de GSSG 1 mmol/L. C) Soluções escuro com presença de GSSG 5 mmol/L. D) Soluções claro com presença de GSSG 5 mmol/L. RB: rosa bengala 20  $\mu$ mol/L.

## 6. DISCUSSÃO

O mecanismo de oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  tem sido intensivamente estudado nos últimos trinta anos (BOITEUX *et al.*, 1992; SHEU; FOOTE, 1993; RAVANAT *et al.*, 2000; NILES *et al.*, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2002; HENDERSON *et al.*, 2003; RAVANAT *et al.*, 2005; CADET; WAGNER, 2013), com grandes avanços no entendimento deste processo. O esclarecimento do efeito da glutathiona nesta oxidação é importante para ajudar a compreender o que de fato acontece no ambiente celular, pois o mesmo possui altas concentrações deste importante antioxidante de baixa massa molecular. Esta concentração varia de acordo com o tipo celular e com o estado de homeostasia de cada indivíduo. Por exemplo, um estudo em humanos de larga escala publicado em 1996 mostrou que a concentração de GSH média no sangue de adultos é de 1,02 mmol/L, mas que estes valores podem ser cerca de 10% mais altos em fumantes (RICHE *et al.*, 1996). Contudo, a concentração de GSH em hepatócitos, células muito ativas do metabolismo, pode chegar a até 10 mmol/L (HUBER *et al.*, 2008). Considerando este tipo de variação, neste estudo julgou-se apropriado o uso de GSH ou GSSG 1 mmol/L e 5 mmol/L. Inclusive, está bem estabelecido que a quantidade de GSSG nunca chegará a 100% *in vivo*. Ainda assim, neste trabalho foram realizados experimentos nesta situação, pois foi considerado que a análise desta possibilidade *in vitro* era essencial para melhor compreender o papel da glutathiona na oxidação da dGuo e da Gua por  $^1\text{O}_2$ . De fato, Samiec *et al.* mostraram que existem situações que favorecem concentrações maiores de GSSG no sangue humano, tais como envelhecimento e diabetes (SAMIEC *et al.*, 1998).

Foi proposto em trabalho anterior que a adição de GSH e GSSG à incubação de dGuo por  $^1\text{O}_2$  gerado por DHPNO<sub>2</sub> poderia modular a distribuição dos produtos de oxidação da dGuo, levando ao acúmulo de 8-oxodGuo em detrimento do produto originalmente preferencial da reação, ou seja, da dSp (PERES, 2012). No presente estudo, estes resultados foram confirmados pelo estudo cinético da incubação da dGuo e da GSH ou GSSG com  $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$  (FIGURA 11).

A hipótese de que a adição de GSH ou GSSG estaria promovendo uma mudança na distribuição dos produtos de oxidação da dGuo de modo a favorecer a geração de 8-oxodGuo também poderia ser devido ao fato de que a GSH e a GSSG poderiam atuar promovendo menor oxidação da 8-oxodGuo recém-formada à dSp, o

que explicaria o acúmulo de 8-oxodGuo. Para testar esta segunda hipótese, foram realizados os experimentos nos quais o nucleosídeo incubado era a 8-oxodGuo, e não sua precursora dGuo. Contudo, antes destas incubações, foi necessário desenvolver uma metodologia de síntese de 8-oxodGuo.

A reação de síntese de 8-oxodGuo deveria ser realizada da maneira mais simples possível, de modo a ter baixo custo. Ainda assim, era necessário um alto rendimento, pois sua finalidade era a incubação de 8-oxodGuo 1 mmol/L com DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L, GSH ou GSSG 1 ou 5 mmol/L e todas variações necessárias para o condução de um experimento íntegro. Assim, a reação de síntese de 8-oxodGuo por oxidação da dGuo por DHPNO<sub>2</sub> foi imediatamente descartada pelo alto custo da produção do precursor DHPN. Já a síntese por fotossensibilização foi descartada pelo receio de haver uma superoxidação da 8-oxodGuo a outros produtos, diminuindo o rendimento da reação. Inclusive, neste trabalho, a síntese do padrão de dSp foi realizada por meio de fotossensibilização do tipo II da dGuo. Considerando todos estes fatores, a escolha foi pela geração de 8-oxodGuo a partir da oxidação da dGuo por reação de Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ascorbato.

Assim, foram escolhidas duas reações descritas na literatura, denominadas reações I e II realizadas a partir dos reagentes Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ascorbato e as mesmas foram modificadas, gerando inicialmente as reações II, IV, V e VI (TABELA 3). As reações III e IV não geraram 8-oxodGuo em quantidade detectável pelo HPLC. O íon oxidante das mesmas era o Fe<sup>2+</sup>, diferentemente do Cu<sup>2+</sup> utilizados nas reações V e VI. De fato, foi demonstrado anteriormente que reações contendo Cu<sup>2+</sup> em solução são mais eficientes em danificar o DNA que reações com quantidades equimolares de Fe<sup>3+</sup> (STOEWE; PRÜTZ, 1987; ARUOMA et al., 1991). Sendo as reações V e VII igualmente eficientes na síntese de 8-oxodGuo, a reação V foi descartada por envolver borbulho de O<sub>2</sub>.

A reação VI (2,5 mmol/L dGuo + 70 mmol/L ácido ascórbico + 6,5 mmol/L EDTA + 1,3 mmol/L CuSO<sub>4</sub> + 50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) continha EDTA em solução, reagente que na presença de Fe<sup>2+</sup> garante auto poder oxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010), mas o mesmo não pode ser afirmado quando o Fe<sup>2+</sup> é substituído pelo Cu<sup>2+</sup>. A reação VI foi então modificada e referida como reação VII (2,5 mmol/L dGuo + 140 mmol/L ácido ascórbico + 1,3 mmol/L CuSO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5%) para verificar se, neste caso, o papel do EDTA estaria sendo anti ou pró-oxidante. Esta mudança aumentou o rendimento da reação de síntese de 8-oxodGuo. Isto pode ser explicado por

observações de outros autores de que o EDTA diminui o dano ao DNA induzido pelo íon  $\text{Cu}^{2+}$  (ARUOMA et al., 1991), embora aumente o dano às bases do DNA induzido por ROS na presença de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ARUOMA et al., 1989). A reação VII foi então modificada para aumentar a estequiometria da dGuo em solução, gerando a reação VIII (3,7 mmol/L dGuo + 140 mmol/L ácido ascórbico + 1,3 mmol/L  $\text{CuSO}_4$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  5%) e esta foi considerada a reação de síntese de melhor rendimento.

A melhor forma de conservar a 8-oxodGuo sintetizada foi realizando uma etapa de pré-purificação imediatamente após a reação de síntese. Embora esta etapa consuma parte da 8-oxodGuo recém sintetizada, ela é importante porque garante que a concentração de 8-oxodGuo restante permaneça estável quando armazenada em  $-20^\circ\text{C}$  por pelo menos 3 meses. Além disso, ela protege a coluna de purificação do HPLC, aumentando sua vida útil. Assim, o rendimento de todas as reações utilizadas foi calculado após esta etapa de pré-purificação. O cálculo deste rendimento foi realizado em função do número de mols (n) de dGuo e de 8-oxodGuo por L (3):

$$R = \frac{n(8\text{-oxodGuo})}{n(d\text{Guo})} \quad (3)$$

onde:

R= rendimento da reação em %

n= número de mols por L

A partir deste cálculo, o rendimento da reação VIII foi de 72,00%, resultado muito superior aos das reações padrão I (2,45%) e II (21,38%). A reação II também teve seu rendimento melhorado ao ser realizada a  $45^\circ\text{C}$ , pois o mesmo chegou a 64,5%.

Com a 8-oxodGuo sintetizada, foram então realizadas as incubações de 8-oxodGuo 1 mmol/L, DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L e GSH ou GSSG 1 ou 5 mmol/L, seguidas da quantificação da 8-oxodGuo e da dSp em solução. Como resultado, a geração de dSp foi totalmente prevenida pela adição de GSH ou de GSSG já na menor concentração, ou seja, 1 mmol/L. A adição dos tióis também preveniu a oxidação da 8-oxodGuo, ainda que não em 100% (FIGURA 19). A prevenção total da oxidação da 8-oxodGuo não foi completa possivelmente em virtude de alguma conversão a

outros produtos de oxidação não investigados neste estudo, tais como imidazolona, oxazolona e ácido cianúrico (RAOUL; CADET, 1996; MARTINEZ *et al.*, 2002).

Estes resultados, em conjunto com os dados de oxidação da dGuo com  $^{18}[^1\text{O}_2]$ , contribuem significativamente para o entendimento do estudo de ação da glutatona, já que a mesma possui conhecida atividade antioxidante e seria esperado que protegesse a oxidação da dGuo. De fato, existe sim uma tendência da GSH e especialmente da GSSG em prevenir a oxidação do nucleosídeo não modificado, considerando que já foi observado que parte do consumo da dGuo foi prevenido pela adição destas substâncias (PERES, 2012). Mas, por alguma razão desconhecida até o momento, a proteção da oxidação da 8-oxodGuo à dSp é maior. Os valores das constantes de *quenching* do  $^1\text{O}_2$  das espécies envolvidas podem estar intimamente ligados à hipótese de que a GSH previne a oxidação da 8-oxodGuo em detrimento da oxidação da dGuo. A constante de *quenching* do  $^1\text{O}_2$  da 8-oxodGuo é mais alto que a da dGuo ( $59 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e  $5,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectivamente) (DEVASAGAYAM *et al.*, 1991b) o que implica diretamente na oxidação preferencial da 8-oxodGuo quando comparada à dGuo. Entretanto, a constante de *quenching* do  $^1\text{O}_2$  da GSH ( $2,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) é ainda menor que a constante de *quenching* do  $^1\text{O}_2$  da dGuo (DI MASCIO *et al.*, 1991), o que indica que estes resultados não podem ser explicados apenas em termos das constantes de *quenching*. O que pode estar acontecendo é que primeiro a dGuo é oxidada a 8-oxodGuo e depois, esta é oxidada a dSp. Por causa desta dinâmica, a GSH que primeiramente agiria prevenindo a oxidação da dGuo, passa depois a prevenir mais eficientemente a oxidação que ocorreria preferencialmente, ou seja, neste caso, a oxidação da 8-oxodGuo à dSp.

Outro ponto a ser considerado é que, no mecanismo de formação da 8-oxodGuo mediado por  $^1\text{O}_2$ , o passo inicial da reação do  $^1\text{O}_2$  com a base púrica da dGuo envolve uma cicloadição do tipo Diels-Alder [2+4] às posições C4 e C8 da dGuo. Estas mudanças originam um produto cíclico, o qual é rearranjado para formar diastereoisômeros do tipo 4,8-endoperóxido. Estes intermediários instáveis abrem e geram 8-hidroperoxi-2'-desoxiguanosina (8-OOHdGuo). Tem sido proposto que a redução desta última espécie gera 8-oxodGuo, e sua desidratação competitiva dá origem à dSp através de um intermediário quinonóide (CADET *et al.*, 2006). Assim, deve ser considerado que a presença de GSH poderia atuar favorecendo a redução da 8-OOHdGuo em detrimento da reação de desidratação. Neste caso, a



formação elevada de 8-oxodGuo na presença de GSH estaria sendo promovida pela redução mais fácil do intermediário 8-OOHdGuo e não seria necessariamente devida à inibição da formação da dSp a partir da 8-oxodGuo. Além disso, Xu e colaboradores (XU *et al.*, 2008) mostraram que a oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  gerado pela fotossensibilização do rosa bengala ou do azul de metileno na presença de lisina gerava *cross-links* de DNA-proteína compostos por dSp e lisina anexados na posição C5 da purina, denominados de 5-Lys-Sp. Assim sendo, a redução do intermediário quinonóide e consequente formação de 8-oxodGuo ao invés de dSp poderia ser uma mecanismo que evita a geração destes *cross-links* do tipo 5-Lys-Sp. Neste caso, a adição de GSH teria um papel importante na prevenção da geração de *cross-links* de DNA-proteína.

O conteúdo residual de glutathiona foi avaliado em todas as amostras, pois estas informações seriam importantes para melhor compreender os resultados da oxidação da dGuo e da 8-oxodGuo discutidos até aqui. De modo geral, a incubação de dGuo 1 mmol/L, DHPNO<sub>2</sub> 5 mmol/L e GSH 1 mmol/L promoveu conversão quase total de GSH a GSSG (FIGURA 20A). Já a mesma incubação com maior quantidade de GSH gerou sua forma dissulfeto em concentrações drasticamente menores (FIGURA 20B). No caso das incubações com GSSG 1 ou 5 mmol/L, houveram poucas mudanças no conteúdo de tiol, exceto pelo fato da presença de dGuo promover alguma redução de GSSG a GSH (FIGURA 20C e D). A espécie responsável por esta redução permanece desconhecida, mas poderia ser um dos intermediários presentes no mecanismo de oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$ . Também pode ser considerada a hipótese de a GSSG reagir com o  $^1\text{O}_2$  gerando um produto que, por decomposição, formasse GSH. O fato de ter sido detectado conteúdo residual da soma de GSH e GSSG menor nas amostras com dGuo pode ser creditado à possível formação de outros produtos de oxidação da GSH, tais como ácidos sulfênicos, sulfínicos e sulfônicos (MEN; WANG, 2005).

Já no caso das incubações com 8-oxodGuo em substituição à dGuo, pode ser percebido que a oxidação da GSH por DHPNO<sub>2</sub> foi originalmente menor. Ainda assim, o nucleosídeo modificado protegeu a oxidação da GSH 1 mmol/L a possíveis intermediários que não a GSSG, tais como ácidos sulfênico e afins (FIGURA 21A). Este efeito foi contrário ao da dGuo nas amostras com GSH 1 mmol/L, pois o nucleosídeo não modificado exacerbou a oxidação da GSH (FIGURA 20A).

No caso das amostras com GSSG 1 ou 5 mmol/L, praticamente não houve mudança no conteúdo residual de tiol após a adição de 8-oxodGuo. Inclusive, a 8-oxodGuo não promoveu a redução da GSSG a GSH. Por isso, a espécie responsável pela redução da GSSG a GSH nas incubações com dGuo deve ser algum dos intermediários presentes no mecanismo de oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$ .

Como não houve oxidação do tiol que justificasse seu consumo para promover proteção química da oxidação da 8-oxodGuo à dSp, os dados sugerem que a GSH e a GSSG agem por a *quenching* físico, pelo menos na oxidação da 8-oxodGuo, ou seja, neste caso as espécies consomem a energia do  $^1\text{O}_2$ , convertendo-o a  $\text{O}_2$ . Outras substâncias como licopeno,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol também agem como *quenchers* físicos do  $^1\text{O}_2$  (DI MASCIO *et al.*, 1989a). O fato da constante de *quenching* do  $^1\text{O}_2$  da 8-oxodGuo ser maior que a da GSH também poderia estar contribuindo para a proteção da oxidação da GSH observada na FIGURA 21A. Ou seja, nas soluções contendo 8-oxodGuo e GSH 1 mol/L, a 8-oxodGuo poderia estar sendo oxidada preferencialmente quando comparada à GSH. Contudo, como nestas incubações a geração de dSp foi zerada (FIGURA 19A), outras rotas de oxidação da 8-oxodGuo podem estar sendo favorecidas neste caso, como aquelas que geram imidazolona e oxazolona (MARTINEZ *et al.*, 2002). Porém, com alteração da estequiometria entre GSH e 8-oxodGuo para 5 vezes a concentração de tiol para cada molécula de 8-oxodGuo, este efeito é perdido, ou seja, não há mais proteção da oxidação da GSH (FIGURA 21B). A combinação dos resultados do papel da GSH e da GSSG na oxidação da 8-oxodGuo por  $^1\text{O}_2$  (FIGURA 19) com os resultados do conteúdo residual de glutathiona nestas incubações (FIGURA 21) implicam que a glutathiona não age no passo de oxidação da 8-oxodGuo a dSp. Isso pode ser confirmado pelo fato de, embora a geração de dSp seja zerada pela adição de glutathiona, isto não pode ser justificado por qualquer mudança no conteúdo residual de GSH/GSSG, diferentemente do que aconteceu nas incubações com dGuo no lugar de 8-oxodGuo.

Como observado no estudo anterior do efeito da adição da GSH e da GSSG na oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  (PERES, 2012), a dGuo consumida não é totalmente convertida a 8-oxodGuo ou dSp. Além da possibilidade de geração de outros produtos de oxidação, a quantificação do conteúdo residual de GSH e GSSG nestas amostras pode indicar outras hipóteses, tais como a formação de um conjugado de glutathiona. Ye e colaboradores (YE *et al.*, 2003) mostraram em um estudo

mecanístico que a dSp seria formada por um ataque de  $\text{H}_2\text{O}$  na posição C5 da forma oxidada da 8-oxodGuo. Levando esta informação em consideração, é factível que a glutathiona desprotonada ( $\text{GS}^-$ ) poderia agir como um nucleófilo e conjugar na posição C5 da 8-oxodGuo oxidada, originando um novo produto (um conjugado), distinto da 8-oxodG ou da dSp. Neste caso, a diminuição da geração da dSp poderia então ser atribuída a uma nova via competitiva, através da geração do conjugado com a glutathiona, a qual contribuiria para a depleção do intermediário chave para a produção de dSp.

Os experimentos realizados em  $\text{D}_2\text{O}$  modificada para atingir pD 9,0 se aproximaram um pouco mais da via de oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  descrita na literatura, pois o produto majoritário foi a dSp, e não a 8-oxodGuo (FIGURA 22). Contudo, neste caso, a geração de 8-oxodGuo foi suprimida. Isto poderia estar acontecendo em função de pDs alcalinos, por si só, atuarem na prevenção da redução da 8-OOHdGuo à 8-oxodGuo, na prevenção da oxidação da 8-oxodGuo à dSp ou no estímulo da geração direta de dSp por hidratação da 8-OOHdGuo. Como os níveis de dSp sem a adição de glutathiona são muito superiores àqueles observados em pD 5,5 (PERES, 2012; PERES *et al.*, 2015), pode-se afirmar que a melhor hipótese é a de que, em pD 9,0, a glutathiona atua na etapa de oxidação direta da dSp, ou seja, no estímulo da hidratação da 8-OOHdGuo.

A medida da glutathiona residual nas incubações em pD 9,0 foi coerente com o fato de que este pD, por estar acima do pKa da cisteína, favorece a oxidação da GSH a GSSG. Assim sendo, as amostras sem nucleosídeo e com GSH tiveram seu conteúdo de GSH totalmente oxidado, e as amostras com GSSG não sofreram mudanças (FIGURA 23). Contudo, a adição de dGuo atuou prevenindo um pouco deste efeito esperado, já que preveniu alguma oxidação da GSH a GSSG (FIGURA 23A e B) e promoveu alguma redução de GSSG a GSH (FIGURA 23C e D).

Como o pD 9,0 estimula a desprotonação da GSH, pode-se afirmar que ele estimula altas concentrações de ânion tiolato em solução. Novamente, estes resultados indicam que, especialmente em pD 9,0, mas também em pD 5,5 (incubações com  $\text{D}_2\text{O}$  pura), o ânion tiolato poderia se conjugar com algum intermediário chave da geração de dSp a partir da dGuo ou mesmo com a própria dGuo (no último caso, gerando o conjugado GS-dGuo). Isso explicaria por que a adição de glutathiona diminuiu o conteúdo de dSp tanto em pD 9,0 (FIGURA 22)

como em pD 5,5 (PERES, 2012) e reduziu os níveis de dGuo sem a geração de 8-oxodGuo ou dSp em pD 9,0 (FIGURA 22).

A oxidação de DNA por  $^1\text{O}_2$  gerou 8-oxodGuo, conforme esperado (FIGURA 27). É importante ressaltar que, no curso da oxidação do DNA por  $^1\text{O}_2$ , não há formação de dSp a partir de 8-oxodGuo. Neste caso, a possível reoxidação da 8-oxodGuo por uma segunda molécula de  $^1\text{O}_2$  leva à geração de produtos intermediários que culminam na produção de ácido oxalúrico, o qual foi qualitativamente analisado por espectrometria de massas (DUARTE *et al.*, 2000b), mas ainda carece de metodologia de quantificação específica. A adição de GSH ou GSSG 1 mmol/L no DNA teve o mesmo efeito observado na dGuo, ou seja, intensificou a geração de 8-oxodGuo. Já na concentração de 5 mmol/L, tanto a GSH quanto a GSSG protegeram a oxidação do DNA a 8-oxodGuo. Inclusive, a proteção da maior concentração de GSH chegou a 100% (FIGURA 27). Sem a quantificação de ácido oxalúrico, não se pode afirmar ao certo qual o verdadeiro efeito da glutathione na oxidação do DNA. O aumento de formação de 8-oxodGuo pela adição da menor concentração dos tióis pode ser devido a uma proteção da geração do produto final, ácido oxalúrico, ou pode ser acompanhado de um igual aumento da geração do produto final. No primeiro caso, a glutathione teria um efeito antioxidante, ainda que nas etapas mais tardias do processo. Da mesma forma, a diminuição ou até supressão total da geração de 8-oxodGuo pelas maiores concentrações de tiol pode indicar uma atividade antioxidante completa se também diminuir os níveis de ácido oxalúrico, ou pode indicar apenas uma proteção da oxidação da 8-oxodGuo. A razão dos efeitos opostos da adição de GSH/GSSG 1 ou 5 mmol/L é muito mais provável de ser devida a uma diferença estequiométrica entre as quantidades de tiol e oxidante, e não apenas um efeito dependente de concentração. Assim sendo, o aumento oxidação do DNA a 8-oxodGuo pela adição de 1 mmol/L de GSH/GSSG seria, pelo menos em parte, resultante de uma atividade ineficaz da glutathione frente a uma quantidade três vezes maior de oxidante (3 mmol/L de  $^1\text{O}_2$ ). Já a diminuição do produto de oxidação em questão pela adição de GSH/GSSG 5 mmol/L seria em parte explicada pelo excesso de antioxidante em relação ao  $^1\text{O}_2$  disponível.

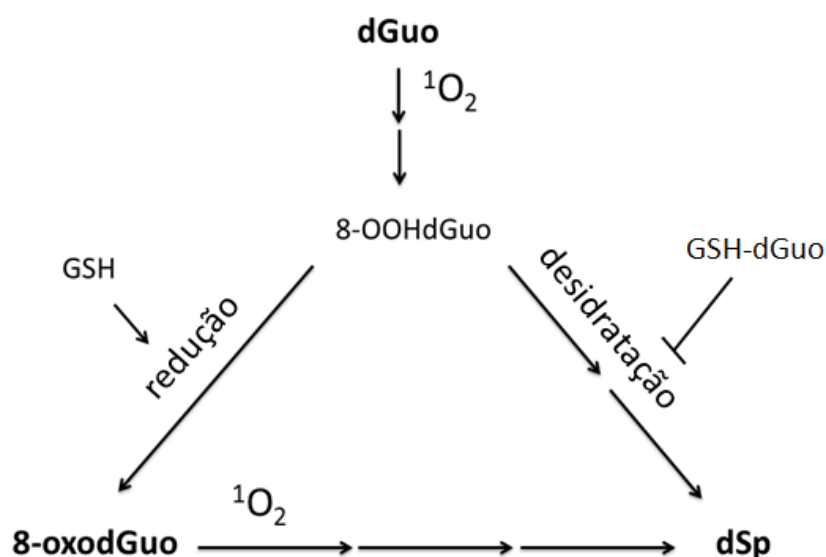
A quantificação do conteúdo residual de GSH/GSSG nas amostras incubadas com DNA de timo de bezerro mostrou que o  $^1\text{O}_2$  gerado pela irradiação de rosa bengala teve pouca influência na oxidação da GSH a GSSG e nenhuma influência na redução de GSSG a GSH (FIGURA 28 e FIGURA 29). A adição de

GSH 1 mmol/L às amostras de DNA aumentou a produção de 8-oxodGuo (FIGURA 27) e também promoveu alguma oxidação de GSH a GSSG (FIGURA 28). Já a adição de GSH 5 mmol/L protegeu totalmente a oxidação da dGuo à 8-oxodGuo (FIGURA 27) e também protegeu um pouco a oxidação da GSH, ainda que não a GSSG, pois o conteúdo dissulfeto permaneceu inalterado (FIGURA 28). Estes resultados são inesperados, pois seria mais natural que quando houvesse proteção da oxidação da dGuo, haveria concomitantemente uma promoção da oxidação da GSH. No caso das amostras com GSSG, o aumento na geração de 8-oxodGuo devido à adição de GSSG 1 mmol/L foi também acompanhado de uma ligeira proteção no conteúdo inicial de GSSG (FIGURA 29). Já a maior concentração de GSSG não sofreu alteração no seu conteúdo dissulfeto, embora tenha diminuído a formação de 8-oxodGuo. A diferença entre a concentração inicial de tiol e a soma de GSH e GSSG residuais nem sempre convergiram a um mesmo valor. Novamente, é importante ressaltar que isto pode ser devido à oxidação a ácidos sulfênicos, sulfinicos e sulfônicos. Um dado interessante foi de que sempre que houve aumento da 8-oxodGuo, também houve ligeiro aumento de GSSG (amostras com GSH e GSSG 1 mmol/L) e quando houve diminuição da formação de 8-oxodGuo, não houve mudança no conteúdo de GSSG (amostras com GSH e GSSG 5 mol/L). Estes dados sugerem que a GSH e a GSSG agem por *quenching* físico do  $^1\text{O}_2$  também nas incubações com DNA, pois não há consumo de tiol que justifique uma ação química. Além disso, a formação de adutos glutathiona-DNA não pode ser descartada, principalmente nas amostras com GSH e GSSG 5 mmol/L. Neste caso, a diminuição da geração de 8-oxodGuo poderia ser devido ao fato de haver menos DNA disponível para ser oxidado, pois o mesmo poderia estar complexado com o excesso de tiol em solução.

## 7. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi analisado o papel da glutathiona, nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), na oxidação do nucleosídeo livre dGuo por  $^1\text{O}_2$  gerado por termodecomposição do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub> e na oxidação do DNA por  $^1\text{O}_2$  gerado por fotossensibilização do rosa bengala. Foi demonstrado que a adição de glutathiona 1 ou 5 mmol/L modifica a oxidação da dGuo por  $^1\text{O}_2$  ao aumentar a geração de 8-oxodGuo em detrimento do produto de reação que deveria ser majoritário, a dSp. A quantificação do conteúdo residual de GSH e de GSSG nas incubações relatadas acima foi essencial para melhor compreender as alterações nas proporções das lesões oxidativas da guanina geradas na presença de glutathiona. De fato, a GSH pode atuar em duas frentes: favorecendo a geração direta da 8-oxodGuo ao atuar como redutora da 8-OOHdGuo ou diminuindo a formação direta de dSp ao se conjugar com algum intermediário da via de desidratação da 8-OOHdGuo. A quantificação da dSp formada na oxidação da 8-oxodGuo por  $^1\text{O}_2$  gerado a partir do DHPNO<sub>2</sub> na presença de GSH ou GSSG mostrou que a glutathiona protege a oxidação da 8-oxodGuo à dSp. Esta incubação também revela que a GSH age apenas como um *quencher* físico na via de geração de dSp por oxidação da 8-oxodGuo. No caso da oxidação do DNA por  $^1\text{O}_2$  gerado a partir de fotossensibilização do tipo II do rosa bengala, apenas a menor concentração de glutathiona (1 mmol/L) possuiu o efeito de aumentar a formação de 8-oxodGuo. Essas conclusões estão sumarizadas na FIGURA 30.

O efeito protetor da glutathiona na oxidação da 8-oxodGuo à dSp por  $^1\text{O}_2$  e o aumento de 8-oxodGuo e diminuição de dSp promovidos pela adição de GSH, mas não pela adição de GSSG, podem ter consequências biológicas como o possível acúmulo de 8-oxodGTP no *pool* de nucleotídeos, o que aumentaria a possibilidade deste produto de oxidação ser inserido pela DNA polimerase no lugar da dGTP. Assim sendo, o papel da GSH, que é considerado antioxidante e benéfico em muitos processos redox, poderia também atuar agravando os efeitos adversos do  $^1\text{O}_2$ .

FIGURA 30 - EFEITO DA GLUTATIONA NA OXIDAÇÃO DA dGUO POR  $^1\text{O}_2$ 

FONTE: Adaptada de Peres *et al.* (2015) com a permissão de Elsevier Copyright © 2015.

NOTA: O  $^1\text{O}_2$  oxida a dGuo a 8-OOHdGuo, que pode gerar 8-oxodGuo por redução ou dSp por desidratação seguida de reidratação. A 8-oxodGuo pode ser reoxidado a dSp por uma segunda molécula de  $^1\text{O}_2$ . A GSH poderia atuar favorecendo a geração de 8-oxodGuo por redução da 8-OOHdGuo e também pela formação de um conjugado de GS-dGuo que competiria com reação de desidratação da 8-OOHdGuo. Contudo, a GSH não age diretamente na via de geração de dSp por oxidação da 8-oxodGuo por  $^1\text{O}_2$ , mas age como um *quencher* físico de  $^1\text{O}_2$  que diminui a concentração de  $^1\text{O}_2$  disponível para oxidar a 8-oxodGuo à dSp.

Uma outra contribuição importante do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia de síntese de 8-oxodGuo por reação de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ /ascorbato com alto rendimento de 72%, o qual é muito superior àqueles apresentados por outras reações propostas na literatura (2 a 21%). Como a 8-oxodGuo é considerada um biomarcador da oxidação do DNA por ROS, sua síntese tem papel indispensável em estudos que requerem a síntese de um padrão interno, sejam eles com isótopos marcados ou não.

## REFERÊNCIAS

- AGNEZ-LIMA, L. F.; MELO, J. T. A.; SILVA, A. E.; OLIVEIRA, A. H. S.; TIMOTEO, A. R. S.; LIMA-BESSA, K. M.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P.; GALHARDO, R. S.; MENCK, C. F. M. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. v. 751, n. 1, p. 15-28, 2012.
- AKASAKA, T.; KAKO, M.; SONOBE, H.; ANDO, W. Reaction of singlet oxygen with thiirane: a peroxysulfenic acid intermediate as a new oxidizing species. **Journal of the American Chemical Society**. v. 110, n. 2, p. 494-496, 1988.
- ALVES DE ALMEIDA, E.; CELSO DIAS BAINY, A.; PAULA DE MELO LOUREIRO, A.; REGINA MARTINEZ, G.; MIYAMOTO, S.; ONUKI, J.; FUJITA BARBOSA, L.; CARRIÃO MACHADO GARCIA, C.; MANSO PRADO, F.; ELIZA RONSEIN, G.; ALEXANDRE SIGOLO, C.; BARBOSA BROCHINI, C.; MARIA GRACIOSO MARTINS, A.; HELENA GENNARI DE MEDEIROS, M.; DI MASCIO, P. Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 146, n. 4, p. 588-600, 2007.
- AMES, B. N. Endogenous Oxidative DNA Damage, Aging, and Cancer. **Free Radical Research**. v. 7, n. 3-6, p. 121-128, 1989.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; GAJEWSKI, E.; DIZDAROGLU, M. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. **Journal of Biological Chemistry**. v. 264, n. 34, p. 20509-20512, 1989.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; GAJEWSKI, E.; DIZDAROGLU, M. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. **Biochem. J.** v. 273, n. 3, p. 601-604, 1991.
- AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. R. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 674, n. 1, p. 101-108, 2009.
- BALD, E.; CHWATKO, G.; GLOWACKI, R.; KUSMIEREK, K. Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography**. v. 1032, n. 1-2, p. 109-115, 2004.
- BERGSTRÖM, T.; ERSSON, C.; BERGMAN, J.; MÖLLER, L. Vitamins at physiological levels cause oxidation to the DNA nucleoside deoxyguanosine and to DNA—alone or in synergism with metals. **Mutagenesis**. v. 27, n. 4, p. 511-517, 2012.
- BLOODWORTH, A. J.; EGGELE, H. J. Face selectivity in the reduction with dideuteriodi-imide of endoperoxides derived from the singlet oxygenation of



cycloalka-1,3-dienes. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2.** v. n. 12, p. 2069-2072, 1984.

BOITEUX, S.; GAJEWSKI, E.; LAVAL, J.; DIZDAROGLU, M. Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. **Biochemistry.** v. 31, n. 1, p. 106-110, 1992.

BOLDOGH, I.; HAJAS, G.; AGUILERA-AGUIRRE, L.; AGUILERA-AGUIRRE, M. L.; RADAK, Z.; BACSI, A.; SUR, S.; HAZRA, T. K.; MITRA, S. Activation of Ras Signaling Pathway by 8-Oxoguanine DNA Glycosylase Bound to Its Excision Product, 8-Oxoguanine. **Journal of Biological Chemistry.** v. 287, n. 25, p. 20769–20773, 2012.

BOS, J. L. Ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer research.** v. 49, n. 17, p. 4682-4689, 1989.

BRODIE, B. B.; AXELROD, J.; SHORE, P. A.; UDERFRIEND, S. Ascorbic aromatic hydroxylation II. Products formed by reaction of substrates with ascorbic acid, ferrous ion, and oxygen **Journal of Biological Chemistry.** v. n. p. 741-750, 1953.

BURROWS, C. J. (2009). Surviving an Oxygen Atmosphere: DNA Damage and Repair. Chemical Evolution II: From the Origins of Life to Modern Society, American Chemical Society. **1025:** 147-156.

CADET, J.; BERGER, M.; DOUKI, T., AND ; RAVANAT, J. L. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biological significance. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** v. 131, n. p. 1-87, 1997.

CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J.-P.; RAVANAT, J.-L.; SAUVAIGO, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.** v. 424, n. 1, p. 9-21, 1999.

CADET, J.; RAVANAT, J.-L.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P. D. Singlet Oxygen Oxidation of Isolated and Cellular DNA: Product Formation and Mechanistic Insights. **Photochemistry and Photobiology.** v. 82, n. 5, p. 1219-1225, 2006.

CADET, J.; TEOULE, R. Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. **Photochemistry and Photobiology.** v. 28, n. 4- 5, p. 661-665, 1978.

CADET, J.; WAGNER, J. R. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.** v. 5, n. 2, p. 2013.

CARNEIRO, C. D.; AMORIM, J. C.; CADENA, S. M. S. C.; NOLETO, G. R.; DI MASCIO, P.; ROCHA, M. E. M.; MARTINEZ, G. R. Effect of flavonoids on 2'-deoxyguanosine and DNA oxidation caused by singlet molecular oxygen. **Food and Chemical Toxicology.** v. 48, n. p. 2380-2387, 2010.

CERCHIARO, G.; BOLIN, C.; CARDOZO-PELAEZ, F. Hydroxyl radical oxidation of guanosine 5'-triphosphate (GTP): requirement for a GTP-Cu(II) complex. **Redox Report**. v. 14, n. 2, p. 82-92, 2009.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I. M. C. M.; WORTELBOER, H.; VAN ZANDEN, J.; VAN BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 10, n. 4, p. 141-152, 2001.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**. v. 447, n. 7147, p. 941-950, 2007.

DEFEDERICIS, H.-C.; PATRZYC, H. B.; RAJECKI, M. J.; BUDZINSKI, E. E.; IJIMA, H.; DAWIDZIK, J. B.; EVANS, M. S.; GREENE, K. F.; BOX, H. C. Singlet Oxygen-Induced DNA Damage. **Radiation Research**. v. 165, n. 4, p. 445-451, 2006.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Singlet oxygen induced single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA: the enhancing effect of thiols. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**. v. 1088, n. 3, p. 409-412, 1991a.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; STEENKEN, S.; OBENDORF, M. S. W.; SCHULZ, W. A.; SIES, H. Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. **Biochemistry**. v. 30, n. 25, p. 6283-6289, 1991b.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; SUNDQUIST, A. R.; DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 9, n. 1, p. 105-116, 1991c.

DI MASCIO, P.; BECHARA, E. J. H.; MEDEIROS, M. H. G.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxyxynitrite with hydrogen peroxide. **FEBS Letters**. v. 355, n. 3, p. 287-289, 1994.

DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 274, n. 2, p. 532-538, 1989a.

DI MASCIO, P.; MURPHY, M. E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 53, n. 1, p. 194S-200S, 1991.

DI MASCIO, P.; WEFERS, H.; DO-THI, H.-P.; LAFLEUR, M. V. M.; SIES, H. Singlet molecular oxygen causes loss of biological activity in plasmid and bacteriophage DNA and induces single-strand breaks. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**. v. 1007, n. 2, p. 151-157, 1989b.

DUARTE, V.; GASPARUTTO, D.; JAQUINOD, M.; RAVANAT, J.-L.; CADET, J. Repair and Mutagenic Potential of Oxaluric Acid, a Major Product of Singlet Oxygen-Mediated Oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanine. **Chemical Research in Toxicology**. v. 14, n. 1, p. 46-53, 2000a.

DUARTE, V.; GASPARUTTO, D.; YAMAGUCHI, L. F.; RAVANAT, J.-L.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H.; DI MASCIO, P.; CADET, J. Oxaluric acid as the major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7, 8-dihydroguanine in DNA. **Journal of the American Chemical Society**. v. 122, n. 51, p. 12622-12628, 2000b.

DUARTE, V.; MULLER, J. G.; BURROWS, C. J. Insertion of dGMP and dAMP during in vitro DNA synthesis opposite an oxidized form of 7,8-dihydro-8-oxoguanine. **Nucleic Acids Research**. v. 27, n. 2, p. 496-502, 1999.

EBLIN, K. E.; BOWEN, M. E.; CROMEY, D. W.; BREDFELDT, T. G.; MASH, E. A.; LAU, S. S.; GANDOLFI, A. J. Arsenite and monomethylarsonous acid generate oxidative stress response in human bladder cell culture. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 217, n. 1, p. 7-14, 2006.

FENTON, H. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society, Transactions**. v. 65, n. p. 899-910, 1894.

FENTON, H. (1899). Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts. Proc. Chem. Soc.

FLEMING, A. M.; MULLER, J. G.; JI, I.; BURROWS, C. J. Characterization of 2[prime or minute]-deoxyguanosine oxidation products observed in the Fenton-like system Cu(ii)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/reductant in nucleoside and oligodeoxynucleotide contexts. **Organic & Biomolecular Chemistry**. v. 9, n. 9, p. 3338-3348, 2011.

FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation **Photochemistry and Photobiology**. v. 54, n. 5, p. 659, 1991.

FOOTE, C. S.; DENNY, R. W. Chemistry of singlet oxygen. XII. Electronic effects on rate and products of the reaction with olefins. **Journal of the American Chemical Society**. v. 93, n. 20, p. 5162-5167, 1971.

FOTI, J. J.; DEVADOSS, B.; WINKLER, J. A.; COLLINS, J. J.; WALKER, G., C. Oxidation of the Guanine Nucleotide Pool Underlies Cell Death by Bactericidal Antibiotics. **Science**. v. 336, n. 315, p. 315-319, 2012.

GAJEWSKI, E.; RAO, G.; NACKERDIEN, Z.; DIZDAROGLU, M. Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. **Biochemistry**. v. 29, n. 34, p. 7876-7882, 1990.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L.; MARKOVIC, J.; DASÍ, F.; QUEVAL, G.; SCHNAUBELT, D.; FOYER, C. H.; PALLARDÓ, F. V. Nuclear glutathione. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**. v. 1830, n. 5, p. 3304-3316, 2013.

GOLDSTEIN, S.; MEYERSTEIN, D.; CZAPSKI, G. The Fenton reagents. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 15, n. 4, p. 435-445, 1993.

HAAG, W. R.; HOIGNE', J. R.; GASSMAN, E.; BRAUN, A. M. Singlet oxygen in surface waters — Part I: Furfuryl alcohol as a trapping agent. **Chemosphere**. v. 13, n. 5, p. 631-640, 1984.

HABER, F.; WEISS, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, The Royal Society.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2010.

HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radical Research**. v. 31, n. 4, p. 273-300, 1999.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 30, n. 6, p. 445-520, 1995.

HELD, A. M.; HALKO, D. J.; HURST, J. K. Mechanism of chlorine oxidation of hydrogen peroxide. **American Chemical Society**. v. 100, n. p. 5732-5741, 1978.

HENDERSON, P. T.; DELANEY, J. C.; MULLER, J. G.; NEELEY, W. L.; TANNENDAUM, S. R.; BURROWS, C. J.; ESSIGMAN, J. M. The Hydantoin lesions formed from oxidation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine are potent sources of replication errors in vivo. **Biochemical Journal**. v. 42, n. p. 9257-9262, 2003.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. v. 31, n. p. 1170-1179, 2008.

JENA, N. R.; MISHRA, P. C. Formation of ring-opened and rearranged products of guanine: Mechanisms and biological significance. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 53, n. 1, p. 81-94, 2011.

JIA, L.; SHAFIROVICH, V.; SHAPIRO, R.; GEACINTOV, N. E.; BROYDE, S. Spiroiminodihydantoin Lesions Derived from Guanine Oxidation: Structures, Energetics, and Functional Implications†. **Biochemistry**. v. 44, n. 16, p. 6043-6051, 2005.

KALAM, M. A.; HARAGUCHI, K.; CHANDANI, S.; LOECHLER, E. L.; MORIYA, M.; GREENBERG, M. M.; BASU, A. K. Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells. **Nucleic acids research**. v. 34, n. 8, p. 2305-2315, 2006.

KANOFISKY, J. R. Singlet oxygen production by biological systems. **Chemico-biological interactions**. v. 70, n. 1, p. 1-28, 1989.

KASAI, H.; NISHIMURA, S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. **Nucleic Acids Research**. v. 12, n. p. 2137 – 2145, 1984.

KASAI, H.; NISHIMURA, S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. **Nucleic Acids Research**. v. 12, n. 4, p. 2137-2145, 1984.

KASAI K; S., N. Hydroxylation of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. **Nucleic Acids Symp Ser**. v. 12, n. p. 165-167, 1983.

KIM, S. Y.; LEE, S. M.; PARK, J.-W. Antioxidant enzyme inhibitors enhance singlet oxygen-induced cell death in HL-60 cells. **Free Radical Research**. v. 40, n. 11, p. 1190-1197, 2006.

KLOTZ, L.-O.; HOLBROOK, N.; SIES, H. UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. v. n. p. 2001.

KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.

LAFLEUR, M. V. M.; HOORWEG, J. J.; JOENJE, H.; WESTMIJZE, E. J.; RETÄ"LL, J. The Ambivalent Role of Glutathione in the Protection of Dna Against Singlet Oxygen. **Free Radical Research**. v. 21, n. 1, p. 9-17, 1994.

LI, W.; BUSU, C.; CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Glutathione in cerebral microvascular endothelial biology and pathobiology: implications for brain homeostasis. **International journal of cell biology**. v. 2012, n. p. 2012.

LLOYD, D. R.; PHILLIPS, D. H. Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 424, n. 1-2, p. 23-36, 1999.

LLUIS, J. M.; MORALES, A.; BLASCO, C.; COLELL, A.; MARI, M.; GARCIA-RUIZ, C.; FERNANDEZ-CHECA, J. C. Critical Role of Mitochondrial Glutathione in the Survival of Hepatocytes during Hypoxia. **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 5, p. 3224-3232, 2005.

MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. **Nature**. v. 355, n. p. 273, 1992.

MARKOVIC, J.; BORRÁS, C.; ORTEGA, Á.; SASTRE, J.; VIÑA, J.; PALLARDÓ, F. V. Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 28, p. 20416-20424, 2007.

MARTINEZ, G. R. **Geração química de oxigênio-18 molecular no estado singleto, <sup>18</sup>O<sub>2</sub> (1Dg), e estudos de lesões em DNA**. PhD. Bioquímica - USP, São Paulo, 2003.

MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; RAVANAT, J. L.; CADET, J.; MASCIÓ, P. D. [18O]-Labeled Singlet Oxygen as a Tool for Mechanistic Studies of 8-Oxo-7,8-

Dihydroguanine Oxidative Damage: Detection of Spiroiminodihydantoin, Imidazolone and Oxazolone Derivatives. **Biological Chemistry**. v. 383, n. 3-4, p. 607-617, 2002.

MARTINEZ, G. R.; RAVANAT, J.-L.; CADET, J.; MIYAMOTO, S.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIIO, P. Energy Transfer between Singlet ( $1\Delta_g$ ) and Triplet ( $3\Sigma_g^-$ ) Molecular Oxygen in Aqueous Solution. **Journal of the American Chemical Society**. v. 126, n. 10, p. 3056-3057, 2004.

MEN, L.; WANG, Y. Further studies on the fragmentation of protonated ions of peptides containing aspartic acid, glutamic acid, cysteine sulfinic acid, and cysteine sulfonic acid. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 19, n. 1, p. 23-30, 2005.

MICHAELS, M. L.; TCHOU, J.; GROLLMAN, A. P.; MILLER, J. H. A repair system for 8-Oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. **Biochemistry**. v. 31, n. 45, p. 10964-10968, 1992.

MIYAMOTO, S.; RONSEIN, G. E.; PRADO, F. M.; UEMI, M.; CORRÊA, T. C.; TOMA, I. N.; BERTOLUCCI, A.; OLIVEIRA, M. C.; MOTTA, F. D.; MEDEIROS, M. H. Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. **Iubmb Life**. v. 59, n. 4-5, p. 322-331, 2007.

MUCHA, A.; CAPPANELLI, M.; SZCZEPANIK, W.; KACZMAREK, P.; SKAŁA, J.; JEŻOWSKA-BOJCZUK, M. Influence of the physiologically widespread substances on the oxidative activity of copper(II) complexes with sinefungin, a nucleoside antibiotic. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 100, n. 2, p. 178-185, 2006.

NILES, J. C.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Spiroiminodihydantoin Is the Major Product of the 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine Reaction with Peroxynitrite in the Presence of Thiols and Guanosine Photooxidation by Methylene Blue. **Organic Letters**. v. 3, n. 7, p. 963-966, 2001.

NILES, J. C.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of product formation. **Nitric Oxide**. v. 14, n. 2, p. 109-121, 2006.

OGILBY, P. R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. **Chemical Society Reviews**. v. 39, n. 8, p. 3181-3209, 2010.

PELLOSI, M. C.; SUZUKAWA, A. A.; SCALFO, A. C.; DI MASCIIO, P.; PEREIRA, C. P. M.; DE SOUZA PINTO, N. C.; DE LUNA MARTINS, D.; MARTINEZ, G. R. Effects of the melanin precursor 5, 6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid (DHICA) on DNA damage and repair in the presence of reactive oxygen species. **Archives of biochemistry and biophysics**. v. 557, n. p. 55-64, 2014.

PERES, P. S. **Efeito da Glutathione na Oxidação da 2'-desoxiguanosina pelo Oxigênio Molecular Singlete**. mestrado. Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

PERES, P. S.; VALERIO, A.; CADENA, S. M. S. C.; WINNISCHOFER, S. M. B.; SCALFO, A. C.; DI MASCIIO, P.; MARTINEZ, G. R. Glutathione modifies the oxidation products of 2'-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 586, n. p. 33-44, 2015.

PIERLOT, C.; AUBRY, J.-M.; BRIVIBA, K.; SIES, H.; MASCIIO, P. D.; LESTER PACKER, H. S. (2000). [1] Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Methods in Enzymology*, Academic Press. **Volume 319**: 3-20.

PRAT, F.; HOU, C.-C.; FOOTE, C. S. Determination of the quenching rate constants of singlet oxygen by derivatized nucleosides in nonaqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*. v. 119, n. 21, p. 5051-5052, 1997.

RAOUL, S.; CADET, J. Photosensitized Reaction of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Identification of 1-(2-Deoxy- $\beta$ -d-erythro-pentofuranosyl)cyanuric Acid as the Major Singlet Oxygen Oxidation Product. *Journal of the American Chemical Society*. v. 118, n. 8, p. 1892-1898, 1996.

RAVANAT, J.-L.; CADET, J. Reaction of Singlet Oxygen with 2'-Deoxyguanosine and DNA. Isolation and Characterization of the Main Oxidation Products. *Chemical Research in Toxicology*. v. 8, n. 3, p. 379-388, 1995.

RAVANAT, J.-L.; CADET, J.; DOUKI, T. Oxidatively Generated DNA Lesions as Potential Biomarkers of In Vivo Oxidative Stress. *Current Molecular Medicine*. v. 12, n. p. 655-671, 2012.

RAVANAT, J.-L.; DI MASCIIO, P.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; CADET, J. Singlet Oxygen Induces Oxidation of Cellular DNA. *Journal of Biological Chemistry*. v. 275, n. 51, p. 40601-40604, 2000.

RAVANAT, J.-L.; SAINT-PIERRE, C.; DI MASCIIO, P.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; CADET, J. Damage to Isolated DNA Mediated by Singlet Oxygen. *Helvetica Chimica Acta*. v. 84, n. 12, p. 3702-3709, 2001.

RAVANAT, J.-L.; SAUVAIGO, S.; CAILLAT, S.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIIO, P. D.; FAVIER, A.; CADET, J. Singlet oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes. *Biological Chemistry*. v. 385, n. 1, p. 17-20, 2005.

RICHIE, J. P.; SKOWRONSKI, L.; ABRAHAM, P.; LEUTZINGER, Y. Blood glutathione concentrations in a large-scale human study. *Clinical Chemistry*. v. 42, n. 1, p. 64-70, 1996.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIIO, P.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*. v. 29, n. p. 563-568, 2006.

SAMIEC, P. S.; DREWS-BOTSCH, C.; FLAGG, E. W.; KURTZ, J. C.; STERNBERG JR, P.; REED, R. L.; JONES, D. P. Glutathione in Human Plasma: Decline in Association with Aging, Age-Related Macular Degeneration, and Diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 24, n. 5, p. 699-704, 1998.

SHEU, C.; FOOTE, C. S. Endoperoxide formation in a guanosine derivative. *Journal of the American Chemical Society*. v. 115, n. 22, p. 10446-10447, 1993.

SHIMIZU, M.; GRUZ, P.; KAMIYA, H.; MASUTANI, C.; XU, Y.; USUI, Y.; SUGIYAMA, H.; HARASHIMA, H.; HANAOKA, F.; NOHMI, T. Efficient and erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase  $\eta$ . **Biochemistry**. v. 46, n. p. 5515-5522, 2007.

SIKORSKA, E.; KHMELINSKII, I.; KOMASA, A.; KOPUT, J.; FERREIRA, L. F. V.; HERANCE, J. R.; BOURDELANDE, J. L.; WILLIAMS, S. L.; WORRALL, D. R.; INSINSKA-RAK, M.; SIKORSKI, M. Spectroscopy and photophysics of flavin related compounds: Riboflavin and iso-(6,7)-riboflavin. **Chemical Physics**. v. 314, n. 1–3, p. 239-247, 2005.

SINGH, R.; MCEWAN, M.; LAMB, J. H.; SANTELLA, R. M.; FARMER, P. B. An improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA samples using immunoaffinity column purification. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 17, n. 2, p. 126-134, 2003.

SPENCER, W. A.; JEYABALAN, J.; KICHAMBRE, S.; GUPTA, R. C. Oxidatively generated DNA damage after Cu(II) catalysis of dopamine and related catecholamine neurotransmitters and neurotoxins: Role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 50, n. 1, p. 139-147, 2011.

STEINBECK, M. J.; KHAN, A.; KARNOVSKY, M. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. **Journal of Biological Chemistry**. v. 267, n. 19, p. 13425-13433, 1992.

STOEWE, R.; PRÜTZ, W. A. Copper-catalyzed dna damage by ascorbate and hydrogen peroxide: Kinetics and yield. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 3, n. 2, p. 97-105, 1987.

SUZUKAWA, A. A. **Papel da feomelanina na formação de lesões oxidativas pelo oxigênio molecular singlete em DNA e em células de melanoma humano**. PhD. Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR, Curitiba, 2012.

SUZUKAWA, A. A.; VIEIRA, A.; WINNISCHOFER, S. M. B.; SCALFO, A. C.; DI MASCO, P.; DA COSTA FERREIRA, A. M.; RAVANAT, J.-L.; DE LUNA MARTINS, D.; ROCHA, M. E. M.; MARTINEZ, G. R. Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 52, n. 9, p. 1945-1953, 2012.

SUZUKI, T. Formation of spiroiminodihydantoin nucleoside from 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by nitric oxide under aerobic conditions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 19, n. 17, p. 4944-4947, 2009.

SUZUKI, T.; YAMAMOTO, K.; HARASHIMA, H.; KAMIYA, H. Base excision repair system supressess mutagenesis caused by 8-hydroxy-dGTP in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Symposium Series**. v. 51, n. p. 51-52, 2007.



VIVANCOS, P. D.; WOLFF, T.; MARKOVIC, J.; PALLARDÓ, F. V.; FOYER, C. H. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. **Biochemical Journal**. v. 431, n. 2, p. 169-178, 2010.

VOEHRINGER, D.; MCCONKEY, D.; MCDONNELL, T.; BRISBAY, S.; MEYN, R. Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 95, n. 6, p. 2956-2960, 1998.

VON SONNTAG, C. **Free-radical-induced DNA damage and its repair**. Springer, 2006.

WALLING, C.; FOOTE, C.; VALENTINE, J.; GREENBERG, A.; LIEBMAN, J. Active Oxygen in Chemistry. **Blackie, New York**. v. n. p. 31, 1995.

WEFERS, H.; SIES, H. Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. **European Journal of Biochemistry**. v. 137, n. 1-2, p. 29-36, 1983.

WILD, A. C.; MULCAHY, R. T. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: Insights into transcriptional control of antioxidant defenses. **Free Radical Research**. v. 32, n. 4, p. 281-301, 2000.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature chemical biology**. v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.

WRIGHT, A.; BUBB, W. A.; HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Singlet Oxygen-mediated Protein Oxidation: Evidence for the Formation of Reactive Side Chain Peroxides on Tyrosine Residues¶. **Photochemistry and Photobiology**. v. 76, n. 1, p. 35-46, 2002.

WRIGHT, A.; HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Photo-oxidation of cells generates long-lived intracellular protein peroxides. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 34, n. 6, p. 637-647, 2003.

XU, X.; MULLER, J. G.; YE, Y.; BURROWS, C. J. DNA-Protein Cross-links between Guanine and Lysine Depend on the Mechanism of Oxidation for Formation of C5 Vs C8 Guanosine Adducts. **Journal of the American Chemical Society**. v. 130, n. 2, p. 703-709, 2008.

YE, Y.; MULLER, J. G.; LUO, W.; MAYNE, C. L.; SHALLOP, A. J.; JONES, R. A.; BURROWS, C. J. Formation of <sup>13</sup>C-, <sup>15</sup>N-, and <sup>18</sup>O-Labeled Guanidinohydantoin from Guanosine Oxidation with Singlet Oxygen. Implications for Structure and Mechanism. **Journal of the American Chemical Society**. v. 125, n. 46, p. 13926-13927, 2003.

YOSHINO, M.; HANEDA, M.; NARUSE, M.; MURAKAMI, K. Prooxidant Activity of Flavonoids: Copper-Dependent Strand Breaks and the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in DNA. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 68, n. 4, p. 468-472, 1999.

ZIMMERMANN, A. K.; LOUCKS, F. A.; SCHROEDER, E. K.; BOUCHARD, R. J.; TYLER, K. L.; LINSEMAN, D. A. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain

groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 40, p. 29296-29304, 2007.

## ANEXOS

## **ANEXO 1**

Atividades desenvolvidas durante o doutorado:

### **Participação em eventos:**

- III Curso de Inverso de Bioquímica e Biologia Celular. Participação como organizadora e palestrante no mini-curso “Mecanismos Celulares de Resposta ao Estresse”. UFPR, 2012.
- I Semana Científica de Bioquímica da UFPR. Apresentação da palestra “Oxidação do DNA por oxigênio singlete”. UFPR, 2013.
- I Mostra Anual de Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas. Apresentação do trabalho “Glutathione modifies the oxidation of the free nucleoside 2'-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen”. UFPR, 2014.
- I Workshop on Redox Processes in Biochemistry. USP-SP, 2014.
- III Semana de Bioquímica da UFPR. Apresentação do trabalho “Síntese de 8-OxodGuo a Partir de Reação de Fenton: Nova Estratégia para um Rendimento Superior”. UFPR, 2015.
- Simpósio dos 50 Anos da Bioquímica. Apresentação do trabalho “Modification on the 2'-Deoxyguanosine Oxidation by Singlet Molecular Oxygen Pathway by Glutathione”. UFPR, 2015.

### **Participação em Comissão organizadora de eventos:**

- Simpósio dos 50 Anos da Bioquímica. UFPR, 2015.

### **Participação em bancas:**

- Avaliação de trabalhos de iniciação científica durante o 22º Evento de Iniciação Científica da UFPR (EVINCI) na área de conhecimento de bioquímica. 2014.

### **Orientação:**

- Co-orientação da aluna de iniciação científica Andressa Valerio. “Oxidação da 2'-Desoxiguanosina e da Glutathione”. 2013-2014.

## **ANEXO 2**

Artigo científico publicado, resultante desta tese.



# Glutathione modifies the oxidation products of 2'-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen



Patrícia S. Peres<sup>a</sup>, Andressa Valerio<sup>a</sup>, Silvia M.S.C. Cadena<sup>a</sup>, Sheila M.B. Winnischofer<sup>a</sup>,  
Alexsandra C. Scalfo<sup>b</sup>, Paolo Di Mascio<sup>b</sup>, Glaucia R. Martinez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Oxidações Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 12 June 2015

Received in revised form

20 September 2015

Accepted 25 September 2015

Available online 30 September 2015

### Keywords:

DNA damage

Glutathione

Singlet molecular oxygen

ROS

2'-Deoxyguanosine

8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine

Spiroiminodihydantoin-2'-

deoxyribonucleosides

## ABSTRACT

The oxidation of the free nucleoside 2'-deoxyguanosine (dGuo) by singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) has been studied over the three last decades due to the major role of DNA oxidation products in process such as ageing, mutation and carcinogenesis. In the present work we investigated the dGuo oxidation by  $^1\text{O}_2$  in the presence of the important low molecular antioxidant, glutathione, in its reduced (GSH) and oxidized (GSSG) forms. There were applied different conditions of concentration, pH, time of incubation, and the use of a [ $^{18}\text{O}$ ]-labeled thermolabile endoperoxide naphthalene derivative as a source of [ $^{18}\text{O}$ ]-labeled  $^1\text{O}_2$ . Data was obtained through high performance liquid chromatography (HPLC) and HPLC coupled to microTOF Q-II analysis of the main oxidation products: the diastereomers of spiroiminodihydantoin-2'-deoxyribonucleosides (dSp) and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo). An intriguing result was that 8-oxodGuo levels increased by 100 fold when dGuo was oxidized by  $^1\text{O}_2$  in the presence of GSH and by 2 fold in the presence of GSSG, while dSp levels dropped to zero for both conditions. All data from dGuo, 8-oxodGuo and dSp quantification together with the analysis of residual GSH/GSSG content in each sample strongly suggest that glutathione modifies the mechanism of dGuo oxidation by  $^1\text{O}_2$  by disfavoring the pathway of dSp formation.

© 2015 Published by Elsevier Inc.

## 1. Introduction

Singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) is a more reactive form of molecular oxygen. It is a non-radical reactive oxygen species (ROS) and is able to oxidize all kinds of biomolecules. It can be generated from diverse processes, as type II photosensitization [1], reaction between hydrogen peroxide and hypochlorite [2] or peroxyxynitrite [3] and also by thermal decomposition of endoperoxides derived from naphthalene [4], such as the *N,N'*-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropylamide (DHPN). Between all biomolecules, DNA deserves special attention due to its crucial role in support of heredity. In that respect, its oxidation can lead to damage with potential mutagenic consequences.

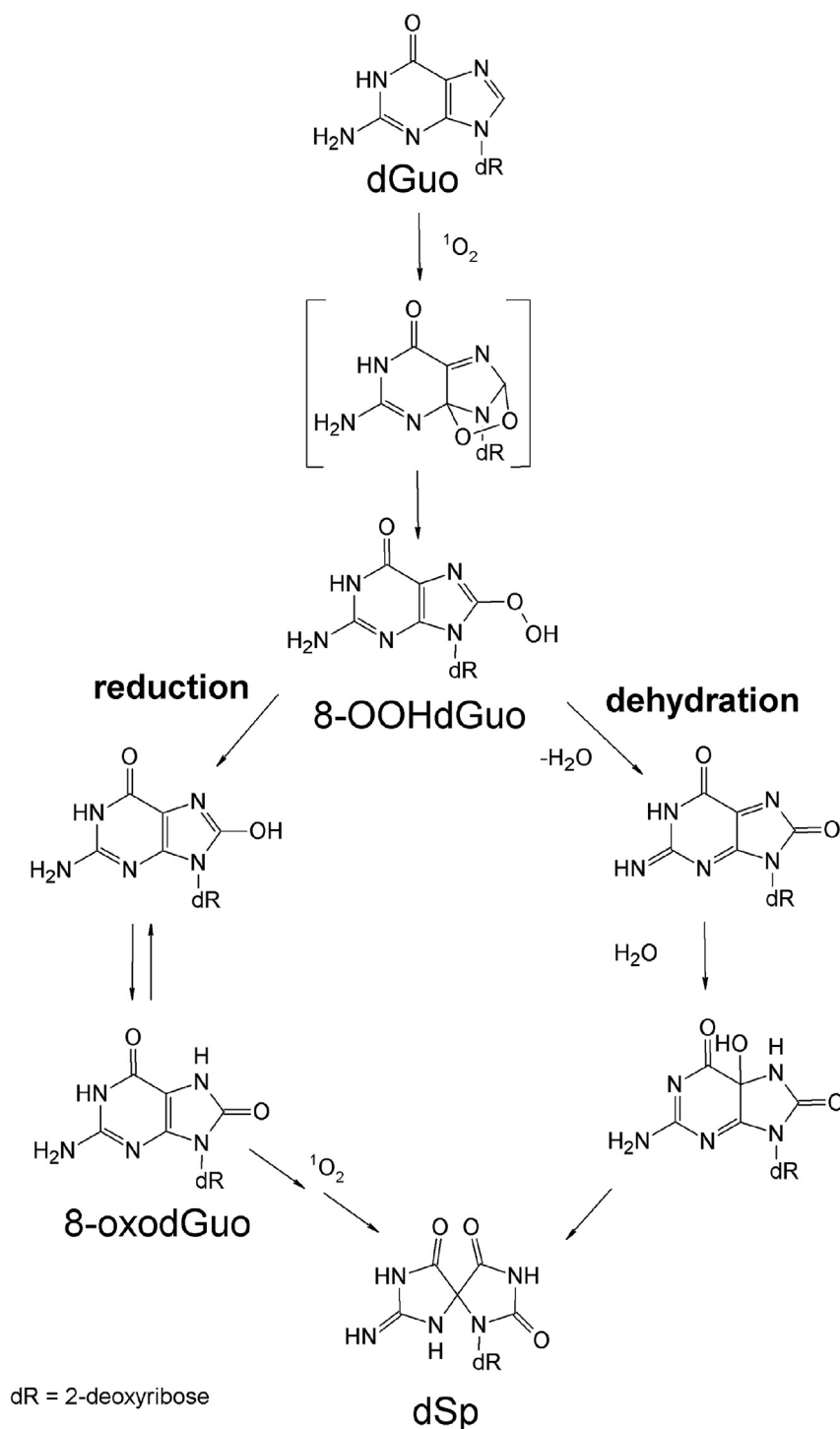
Although other ROS such as hydroxyl radicals are able to react with all DNA bases,  $^1\text{O}_2$  does it specifically with the guanine moiety [5]. The reaction of  $^1\text{O}_2$  and the free nucleoside 2'-deoxyguanosine

(dGuo) can generate various oxidized products, like the diastereomers of spiroiminodihydantoin-2'-deoxyribonucleosides (dSp) [6], 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) [7] and 2-amino-5-[(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)amino]-4H-imidazol-4-one (dlz) and 2,2-diamino-4-[(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)amino]-5-(2H)-oxazolone (dOz) [8]. The dSp products are formed in higher amount when compared to the 8-oxodGuo yield [6] and have a high mutagenic potential *in vivo* [9]. The product 8-oxodGuo can be mutagenic as well, because it is able to pair with adenine, resulting in a G → T transversion [10]. When it is formed from dGTP in the nucleotide pool, 8-oxodGTP can be inserted in the new DNA strand by DNA polymerase and lead to mutation [11]. On the other hand, up to now, there is no data supporting that triphosphate dSp can or cannot be inserted into DNA strand by this enzyme.

The mechanism of oxidation of dGuo by  $^1\text{O}_2$  has been extensively studied in the last thirty years [5–10,12,13] and the current knowledge about it can be summarized as presented in Fig. 1. As shown, the oxidation of the free nucleoside dGuo by  $^1\text{O}_2$  follows

\* Corresponding author.

E-mail address: [grmartinez@pq.cnpq.br](mailto:grmartinez@pq.cnpq.br) (G.R. Martinez).



**Fig. 1.** Mechanism of oxidation of dGuo by singlet oxygen in aqueous solution. 2'-Deoxyguanosine can be oxidized by a  $^1\text{O}_2$  molecule to 8-OOHdGuo that gives rise to 8-oxodGuo by reduction or dSp by dehydration/rehydration. Newly formed 8-oxodGuo can be oxidized by a second  $^1\text{O}_2$  molecule originating more dSp.

two main pathways from a common intermediate: one that leads to the direct formation of dSp, and other that forms 8-oxodGuo. First two diastereomeric 4,8-endoperoxides are formed through a Diels–Alder [2 + 4] cycloaddition across the C4 and C8 positions of dGuo. This unstable cyclic intermediate gives rise to 8-hydroperoxy-2'-deoxyguanosine (8-OOHdGuo), which can be reduced and thus generate 8-oxodGuo, although the reducing agent and process remain unclear. The other possibility for this

intermediate is its dehydration/hydration to give rise to dSp. Furthermore, the 8-oxodGuo formed can be oxidized by another  $^1\text{O}_2$  molecule and most probably originating a 5-hydroperoxide intermediate that is able to generate dSp upon substantial rearrangement or oxazolone from its precursor imidazolone [8].

The reduced glutathione (GSH) represents the most important low molecular weight thiol present in cells [14] and is a critical element in the redox balance and in the regulation and cell

signaling pathway maintenance. It can act as a first line antioxidant, being a co-factor for peroxide reduction with the concomitant glutathione disulfide (GSSG) formation mediated by the enzyme glutathione peroxidase [15]. In order to preserve intracellular GSH levels, the glutathione reductase catalyzes the opposite generation of GSH from GSSG at the expense of NADPH [16].

The relationship between glutathione and  $^1\text{O}_2$  is quite controversial. It has been shown that GSH itself could generate  $^1\text{O}_2$  when in contact with superoxide anion radical [17]. Different thiols, including GSH, were reported as quenchers of  $^1\text{O}_2$  and this property increased at higher pHs [18]. Another study tested the effect of various thiols, including GSH, on dGuo oxidized by  $^1\text{O}_2$  generated by thermal decomposition of the endoperoxide disodium salt of 3,3'-(1,4-naphthylidene) dipropionate (NDPO<sub>2</sub>). It was shown that some thiols raised the levels of 8-oxodGuo formation induced by  $^1\text{O}_2$  generated by 40 mM NDPO<sub>2</sub> [19]. Even though, no attempt to detect and quantify dSp or the GSH/GSSG was done in any of these studies.

In the present work, we analyzed the role of glutathione, in its reduced and oxidized forms, in the oxidation of the free nucleoside dGuo by  $^1\text{O}_2$  generated from the thermolysis of DHPNO<sub>2</sub> with the goal of understanding and differentiating their mode of action and to propose how they can affect the distribution of dGuo oxidatively generated products.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The endoperoxide DHPNO<sub>2</sub> was synthesized as previously reported [4], and so the [ $^{18}\text{O}$ ]-labeled DHPNO<sub>2</sub> [20]. The diastereomeric spiroiminodihydantoin nucleosides (dSp) were purified by HPLC as described elsewhere [8]. 8-OxodGuo was synthesized in accordance with Kasai and Nishimura [21]. The following reagents were acquired from Sigma-Aldrich (Brazil): reduced L-glutathione (G4251), oxidized L-glutathione disodium salt (G4626), 2'-deoxyguanosine monohydrate (D7145) and deuterated water (deuterium oxide, D<sub>2</sub>O).

### 2.2. Incubation of GSH or GSSG with dGuo or 8-oxodGuo and DHPNO<sub>2</sub>

In order to evaluate dGuo oxidation and the formation of products (8-oxodGuo and dSp), solutions were prepared containing 1 mM dGuo, 1 mM or 5 mM GSH or GSSG and 5 mM DHPNO<sub>2</sub>. Experiments were performed in deuterated water, because it is able to increase the  $^1\text{O}_2$  lifetime, and in deuterated water modified by NaOH to achieve pH 9. Solutions were incubated at 37 °C under soft agitation for 2.5 h, enough time for the complete decomposition of the endoperoxide [4]. Similar solutions were prepared with 8-oxodGuo instead of dGuo or with [ $^{18}\text{O}$ ]-labeled DHPNO<sub>2</sub> instead of DHPNO<sub>2</sub>, these last ones only in deuterated water.

### 2.3. Detection and quantification of dGuo and its oxidation products

The free nucleoside dGuo and dSp were detected by HPLC according to Martinez et al. [8], setting the UV detector in 230 nm for dSp and 254 nm for dGuo. The mobile phase was composed of 65% acetonitrile, 25% ammonium formate (25 mM) and 10% methanol and was submitted to a 0.8 mL/min flow rate. 8-OxodGuo was revealed by a C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm) and an electrochemical detector coupled to HPLC, as published earlier [22]. Each injection (sample or standard solution) had a volume of 20 μL. Limit detection for 8-oxodGuo was of 0.05 μM and for dSp was of 13.2 μM.

Also, while incubating dGuo with [ $^{18}\text{O}$ ]-labeled DHPNO<sub>2</sub>, unlabeled and [ $^{18}\text{O}$ ]-labeled 8-oxodGuo were detected by HPLC coupled to microTOF Q-II in the positive mode with collision energy of 3 eV. The nebulizer was set at 4 Bar, the dry gas had an 8 L/min flow and the dry temperature was set at 240 °C. In this case, a BDS Hypersil C18 column (250 × 2.1 mm, 5 μm) was used with a 0.2 mL/min flow of a gradient composed of formic acid 0.1% (A) and methanol (B) as it follows: 0–20 min, 5% B; 20 min, 15% B; 25 min, 20% B 30 min, 5% B. It was injected 50 μL of each sample. Unlabeled 8-oxodGuo shows a *m/z* of 284 and [ $^{18}\text{O}$ ]-labeled 8-oxodGuo shows a *m/z* of 286, as their unique difference was the presence of a  $^{18}\text{O}$  molecule instead of a  $^{16}\text{O}$  one.

### 2.4. Measurement of the GSH/GSSG content

The GSH/GSSG content was analyzed through HPLC setting the UV detector at 215 nm and using a Hypersil Gold C-18 (250 × 4.6 mm, 5 μm) under a 0.8 mL/min flow. The mobile phase consisted of 5% methanol and 95% of a solution composed of formic acid 50 mM and octanosulfonate 50 μM at pH 2.7. It was injected 20 μL of standards or sample solutions.

### 2.5. Statistical analysis

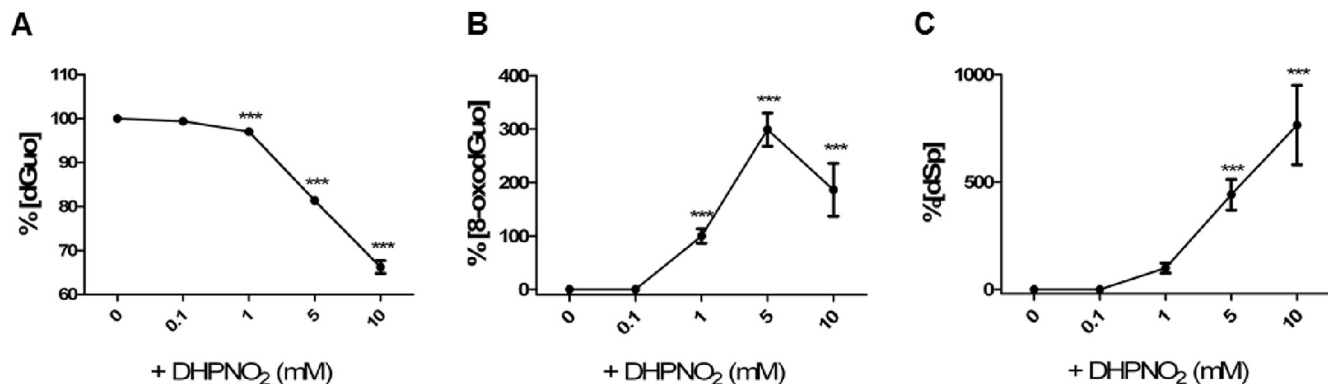
Reported values are presented as the mean ± SD. Differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test through GraphPad Prism 6 software. Significance level was set as *p* < 0.05.

## 3. Results and discussion

In order to better understand the relationship between dGuo and  $^1\text{O}_2$ , it was first evaluated the effect of different concentrations of  $^1\text{O}_2$  generated from the DHPNO<sub>2</sub> thermolysis (0.1, 1, 5 and 10 mM) upon dGuo oxidation. Data are presented in percent aiming to show a more effective comparison between the different products, since the proportion between them is very different. This trial revealed that the 5 mM concentration of DHPNO<sub>2</sub> was appropriate for the following experiments, as it promoted dGuo consumption and 8-oxodGuo and dSp formation (Fig. 2). However, it should be appreciated that the yield of  $^1\text{O}_2$  released from the complete thermolysis of the endoperoxide in aqueous solution at 37 °C is about 60% [4] so that the final concentrations of  $^1\text{O}_2$  in these systems were actually around 0.06, 0.6, 3 and 6 mM. It is important to highlight those reactions were also performed using 5 mM DHPN instead of 5 mM DHPNO<sub>2</sub> and in these cases; there was no alteration in the dGuo consumption or in the oxidation product formation (Table 1). These results confirm that all effects observed are due to the  $^1\text{O}_2$  generated after DHPNO<sub>2</sub> decomposition.

Several other studies have also investigated the formation of dGuo oxidation products by  $^1\text{O}_2$  [8,19,23–25]. It is known that the higher production of dSp over 8-oxodGuo occurs because the very newly formed 8-oxodGuo is being immediately overoxidized to dSp, by a second  $^1\text{O}_2$  molecule. In the present work, the amount of dSp found was about 50 fold higher than that of 8-oxodGuo (Table 1). This result was expected as the ratio dSp/8-oxodGuo increases with the extent of  $^1\text{O}_2$  oxidation of dGuo since the level of 8-oxodGuo plateaus to less than 1% whereas the formation of dSp increases until dGuo is totally consumed. The fact that the  $^1\text{O}_2$  quenching constant of 8-oxodGuo is higher than the  $^1\text{O}_2$  quenching constant of dGuo ( $59 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  over  $5.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , respectively [20]) certainly contributes to that. In fact, Martinez et al. [23] showed, using isotopic [ $^{18}\text{O}$ ]-labeled  $^1\text{O}_2$  that the levels of 8-oxodGuo increase in the first 10 min and then decrease considerably, while dSp levels rise in a linear curve and stabilize after





**Fig. 2.** 2'-Deoxyguanosine (dGuo) and its oxidation products percent after adding different concentrations of DHPNO<sub>2</sub>. Incubation and detection of dGuo, 8-oxodGuo and dSp as described in Materials and Methods, Sections 2 and 3. All solutions were prepared in deuterated water. Results are represented as mean ± standard deviation of two independent experiments in triplicate. (\*\*\*) Values statistically different from control with p < 0.001. Average concentration of dGuo considered as 100% is 1.00 ± 0.05 mM, average concentration 8-oxodGuo considered as 100% is 1.05 ± 0.06 μM, and average concentration of dSp considered as 100% is 0.205 ± 0.010 mM. The error bar is also shown for dGuo, but its value is too small to be noticed on the scale shown.

**Table 1**  
Comparison between the concentrations of dGuo, 8-oxodGuo and dSp generated by 5 mM DHPN or DHPNO<sub>2</sub>. Incubation and detection as described in Materials and Methods, Sections 2 and 3. All solutions were prepared in deuterated water. Results are represented as mean ± standard deviation of two independent experiments in triplicate. Control stands for 1 mM dGuo in aqueous solution. ND: not detected.

	dGuo (mM)	8-oxodGuo (mM)	dSp (mM)
Control	1.09 ± 0.06	ND	ND
DHPN 5 mM	1.04 ± 0.07	ND	ND
DHPNO <sub>2</sub> 5 mM	0.76 ± 0.01	0.004 ± 0.001	0.201 ± 0.031

20 min of dGuo (5 mM) incubation with DHPNO<sub>2</sub> (20 mM). The proportion of labeled products showed that there is a very important contribution of the oxidation of 8-oxodGuo, as about 50% of the dSp has been formed in this way.

The next step was the analysis of the effect of the addition of 1 mM or 5 mM GSH or GSSG to the 1 mM dGuo plus 5 mM DHPNO<sub>2</sub> solutions. A large scale human study published in 1996 showed a GSH mean of 1.02 mM in the blood of adults, but these values would increase in around 10% in smokers individuals [26]. Nevertheless, GSH concentrations can reach 10 mM in hepatocytes [16], so we found that the use of 1 mM and 5 mM of GSH or GSSG was appropriate for this study. Tables 2 and 3 show that without the presence of GSH or GSSG, the oxidation of dGuo by <sup>1</sup>O<sub>2</sub> follows the expected distribution of products with the overwhelming production of dSp. In the presence of GSH or GSSG, the increase of 8-oxodGuo is evidenced and no dSp is detected. The leftover of consumed dGuo may be associated to other oxidation products or to an adduct dGuo-GSH. Also, data in percentage (Table 3) clearly indicate that the presence of GSH or GSSG alters the distribution of the oxidation products of dGuo.

It is well known that the amount of GSSG will never get to 100% *in vivo*. However, analysis of this possibility *in vitro* is essential to better understand the role of glutathione in the oxidation of dGuo by <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Indeed, Samiec et al. have shown that there are situations

**Table 2**  
Quantitative aspects of the measurement of dGuo and oxidation products in concentration. Incubation and detection as described in Materials and Methods, Sections 2 and 3. All solutions were prepared in deuterated water. Results are represented as mean ± standard deviation of two independent experiments in triplicate. ND: not detected.

	Consumed dGuo (mM)	Generated 8-oxodGuo (mM)	Generated dSp (mM)
DHPNO <sub>2</sub> 5 mM	0.24 ± 0.056	0.004 ± 0.001	0.201 ± 0.031
+GSH 5 mM	0.14 ± 0.051	0.039 ± 0.002	ND
+GSSG 5 mM	0.03 ± 0.002	0.007 ± 0.001	ND

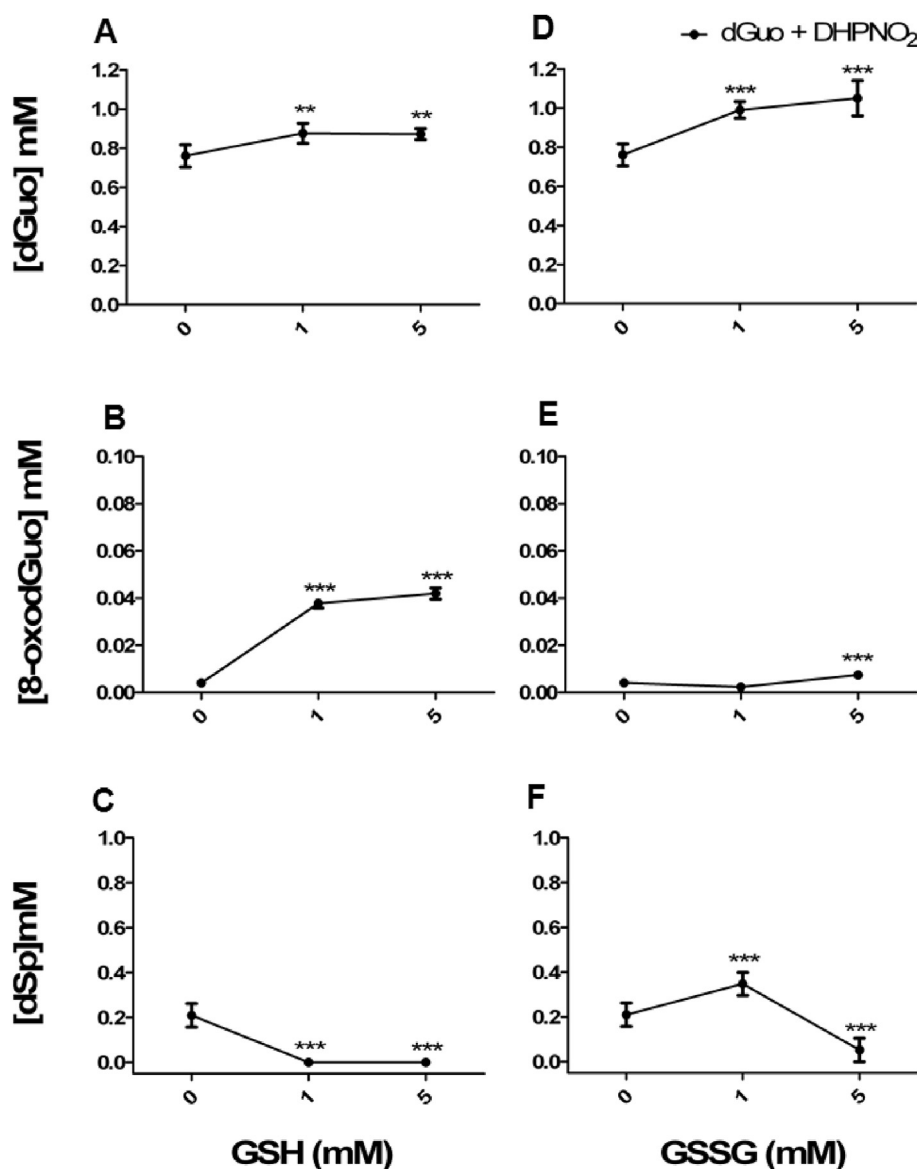
which favor higher levels of GSSG in human blood, such as ageing and diabetes [27]. Final pD in solutions was measured as being of 5.5. Fig. 3 shows dGuo consumption (Fig. 3A and D) and 8-oxodGuo (Fig. 3B and E) and dSp (Fig. 3C and F) generation before and after glutathione addition. It is important to highlight that 100% of dGuo corresponds to the amount of dGuo already consumed by 5 mM DHPNO<sub>2</sub>, this means around 0.76 mM of dGuo for Fig. 3A and D. After GSH or GSSG were added to the solutions, it was observed some protection in dGuo oxidation, as its concentration raised up to about 0.86 mM after 1 or 5 mM GSH addition (Fig. 3A) and up to around 0.97 mM after 1 mM GSSG addition (Fig. 3D), which means 5 mM GSSG prevented almost completely dGuo oxidation, because the residual content is near to its original concentration of 1 mM. 8-OxodGuo levels (Fig. 3B and E), which were around 4 μM after 5 mM DHPNO<sub>2</sub> addition to 1 mM dGuo, increased almost 10-fold with the addition of 1 and 5 mM GSH, reaching close to 39 μM in the higher concentration of glutathione (Fig. 3B). Even 5 mM GSSG promoted the generation of around 7.5 μM of 8-oxodGuo, it prevented the oxidation of dGuo in near 100%. Furthermore, it shows that GSSG tends to protect dGuo oxidation more than GSH does it.

We propose that the addition of thiol could modulate the distribution of dGuo oxidation products, leading to 8-oxodGuo formation at the expense of dSp generation. The dSp content was analyzed to check this hypothesis, and it is important to highlight that the analysis of other oxidation products besides 8-oxodGuo has never been performed in these conditions before. In our study, dSp formation indeed dropped to zero after 1 or 5 mM GSH addition and also decayed to near zero after 5 mM GSSG addition (Fig. 3C and F). Interestingly, addition of 1 mM GSSG had no effect on the 8-oxodGuo content and raised dSp, while addition of 5 mM GSSG behaved similarly to GSH, which means increased 8-oxodGuo levels and decreased dSp levels. The fact that solutions containing dGuo, DHPNO<sub>2</sub> and 5 mM GSSG after reaction showed around 0.86 mM of remaining dGuo and only 39 μM of newly formed 8-oxodGuo indicates that there is still some dGuo that is modified

**Table 3**

Quantitative aspects of the measurement of dGuo and oxidation products in percentage. Incubation and detection as described in Materials and Methods, Sections 2 and 3. All solutions were prepared in deuterated water. Results are representative of two independent experiments in triplicate.

	Consumed dGuo (%)	Generated 8-oxodGuo (% from consumed dGuo)	Generated dSp (% from consumed dGuo)
DHPNO <sub>2</sub> 5 mM	24	1.7	84
+GSH 5 mM	14	30	0
+GSSG 5 mM	3	23	0

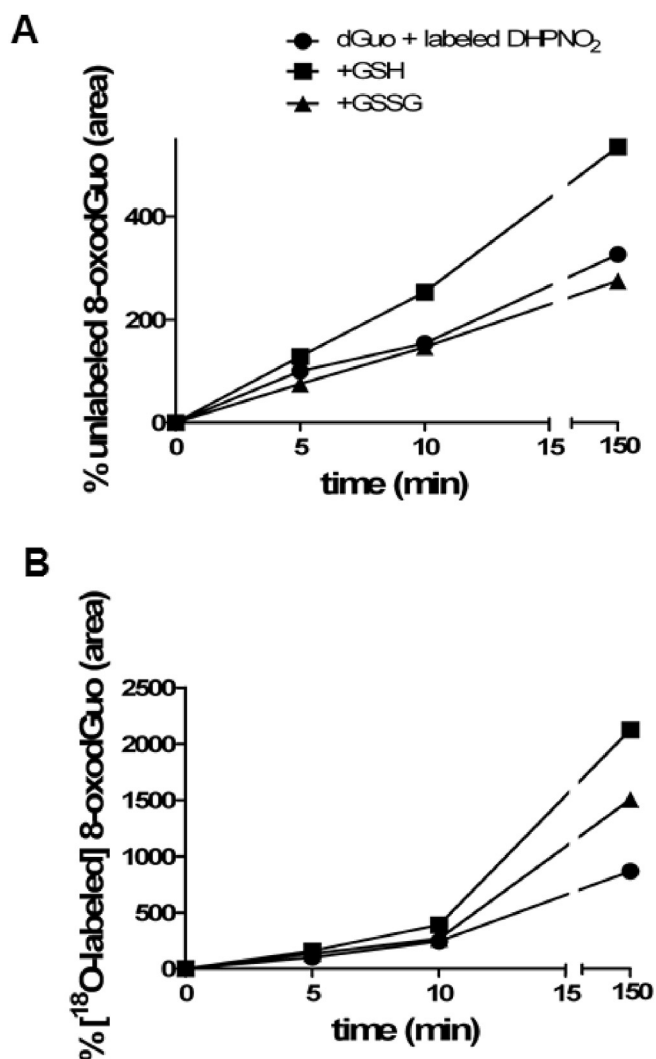


**Fig. 3.** Effect of GSH and GSSG on dGuo oxidation by 5 mM DHPNO<sub>2</sub>. Incubation and detection as described in Materials and Methods, Sections 2 and 3. Results presented as mean  $\pm$  standard deviation from 2 independent experiments in triplicate. (\*\*\*\*) Values statistically different from control with  $p < 0.001$  and (\*\*) Values statistically different from control with  $p < 0.01$ . Control stands for incubation of 1 mM dGuo and 5 mM DHPNO<sub>2</sub>.

but not to generate 8-oxodGuo or dSp. This difference in dGuo consumption may be due to the formation of other 8-oxodGuo oxidation products, such as imidazolone and oxazolone [8] or cyanuric acid, which was found to be the main product of dGuo oxidation in aqueous solution by Raoul and Cadet [28].

The increase in 8-oxodGuo formation in the presence of GSH or GSSG to the medium was confirmed by HPLC coupled to microTOF Q-II analysis (Fig. 4). In this assay, 1 mM dGuo was incubated with 5 mM [<sup>18</sup>O]-labeled DHPNO<sub>2</sub> instead of DHPNO<sub>2</sub>. This modification

should address to the generation of [<sup>18</sup>O]-labeled 8-oxodGuo. However, the generated <sup>18</sup> [<sup>1</sup>O<sub>2</sub>] can transfer its energy to the molecular O<sub>2</sub> present in the medium before reacting to the dGuo and generates unlabeled <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, which promotes formation of unlabeled 8-oxodGuo [20]. As the amount of energy transfer could not be accurate, results of GSH or GSSG influence were presented in terms of percentage from the control composed only by dGuo and [<sup>18</sup>O]-labeled DHPNO<sub>2</sub> in deuterated water solution after 5 min of reaction. The kinetic study shows that both percentage of unlabeled



**Fig. 4.** Percent of unlabeled and [<sup>18</sup>O]-labeled 8-oxodGuo in the presence of GSH and GSSG addition. Incubation and detection as described in Materials and Methods, Sections 2 and 3. Briefly, 50  $\mu$ L of solutions composed of 1 mM dGuo, 5 mM [<sup>18</sup>O]-labeled DHPNO<sub>2</sub> and 5 mM GSH or GSSG in deuterated water were injected onto a HPLC coupled to microTOF Q-II set in the positive mode. Unlabeled 8-oxodGuo had a  $m/z$  of 284 and [<sup>18</sup>O]-labeled 8-oxodGuo had a  $m/z$  of 286, as their unique difference was a <sup>18</sup>O molecule in place of a <sup>16</sup>O one. Results are presented as percent of control consisting of 1 mM dGuo and 5 mM [<sup>18</sup>O]-labeled DHPNO<sub>2</sub> in deuterated water after 5 min of reaction.

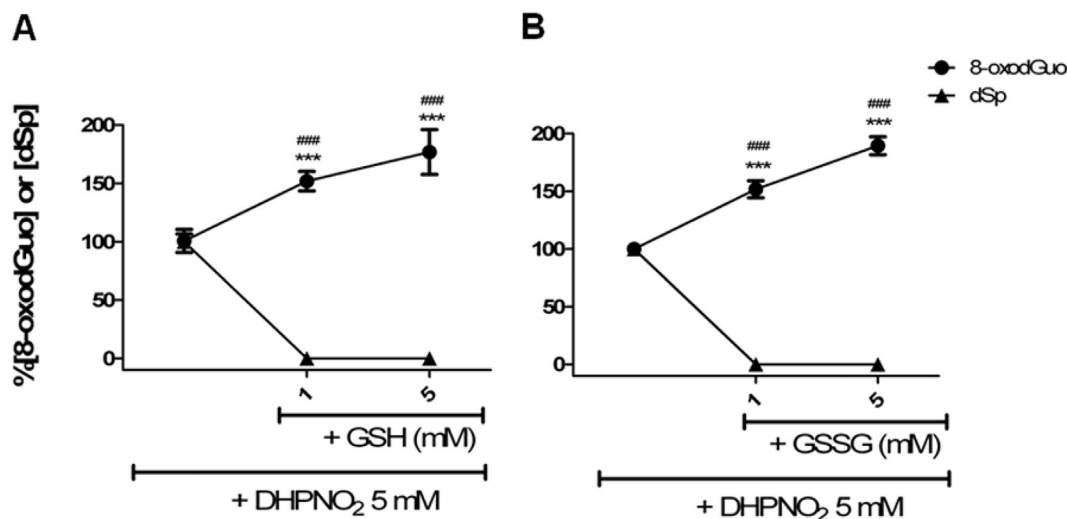
and [<sup>18</sup>O]-labeled 8-oxodGuo increases after GSH addition and that the last one can reach 2.5 fold the control. The kinetic of formation of unlabeled 8-oxodGuo for samples with GSSG was very similar to control. However, only the [<sup>18</sup>O]-labeled 8-oxodGuo increases with GSSG, in a kinetic very similar to the GSH content. As experiments with unlabeled DHPNO<sub>2</sub> (Fig. 3E) show that the presence of GSSG in D<sub>2</sub>O solutions leads to an increase in the 8-oxodGuo content, these results with GSSG and [<sup>18</sup>O]-labeled are in accordance when we consider the final 8-oxodGuo concentration is actually a sum of the unlabeled and the [<sup>18</sup>O]-labeled 8-oxodGuo. The detection and quantification of [<sup>18</sup>O]-labeled dSp indicate that both GSH and GSSG at 5 mM concentration can drop the dSp content to zero, just as demonstrated in Fig. 3C and F in which unlabeled DHPNO<sub>2</sub> was employed.

However, the hypothesis that the addition of GSH or GSSG promotes a shift in the distribution of dGuo oxidation products that favors 8-oxodGuo could be due also to the fact that GSH and GSSG

could be affecting the oxidation of 8-oxodGuo to dSp, causing 8-oxodGuo accumulation. In order to test this second hypothesis, the same assays were performed in samples containing 1 mM 8-oxodGuo and 5 mM DHPNO<sub>2</sub> (which yields 3 mM <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) in deuterated water. Fig. 5 shows a similar behavior in the presence of GSH (Fig. 5A) and of GSSG (Fig. 5B), as both annulled dSp formation. The observation that there is even more 8-oxodGuo after thiol addition shows clearly that the 8-oxodGuo consumption was partly prevented by GSH or GSSG addition. After incubation with 5 mM DHPNO<sub>2</sub>, the initial concentration of 1 mM of 8-oxodGuo turned down to  $0.31 \pm 0.02$  mM. Then, after addition of 5 mM GSH, a concentration of 0.53 mM is observed and after addition of 5 mM GSSG, around 0.59 mM. Total prevention of 8-oxodGuo oxidation was not effective probably due to some of its conversion to other oxidation products not investigated in this study, such as imidazolone, oxazolone and cyanuric acid. This set of results adds an important contribution to the study of the action of GSH, as it has an antioxidant activity and it would be believed to act by preventing the oxidation of dGuo. In fact, there is also a tendency for GSH and specially GSSG to prevent the oxidation of the free nucleoside, considering that the consumption of dGuo was prevented by the addition of the thiol (Fig. 3A and D). But for some unknown reason, glutathione protection of 8-oxodGuo oxidation to dSp is more efficient. The values of the <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quenching constants of the species involved may be intimately linked to the hypothesis that GSH prevents 8-oxodGuo oxidation at the expense of dGuo. As mentioned earlier, the <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quenching constant of 8-oxodGuo is higher than the dGuo one ( $59 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  over  $5.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [19] which implies that 8-oxodGuo is oxidized preferentially instead of dGuo. However, the <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quenching constant of GSH ( $2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) is even smaller than <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quenching constant of dGuo [29], which indicate that results cannot be explained only by quenching constants. What may be occurring is that first dGuo is oxidized to 8-oxodGuo and this species oxidizes again to dSp. Because of this, the GSH that at first would act preventing the oxidation of dGuo, later would prevent more efficiently the oxidation that occurs the most, what means, the oxidation of 8-oxodGuo to dSp.

An important point that must be considered is that, in the mechanism for the <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-mediated formation of 8-oxodGuo, the initial step of the reaction of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> with the purine base of dGuo involves a Diels–Alder [2 + 4] cycloaddition to the C4 and C8 positions of dGuo that led to a cyclic product, which is rearranged to generate diastereomeric 4,8-endoperoxides. The latter unstable cyclic intermediates are able to open giving rise to 8-hydroperoxy-2'-deoxyguanosine (8-OOHdGuo). As it has been proposed, reduction of the latter hydroperoxide generates 8-oxodGuo, while competitive dehydration gives rise to dSp through a quinonoid intermediate [30]. Therefore the presence of GSH could be favoring the reduction of 8-OOHdGuo at the expense of the dehydration reaction. Thus, the elevated formation of 8-oxodGuo in the presence of GSH may be promoted by the more facile reduction of the 8-OOHdGuo intermediate at the expense of the dehydration reaction and its consequent dSp formation, and it is not due necessarily to the inhibited formation of dSp product from 8-oxodGuo. Xu and co-workers [31] demonstrated that oxidation of dGuo by singlet oxygen generated by photosensitization by Rose Bengal or methylene in the presence of lysine generated the DNA-protein cross-link composed by dSp and lysine appended at the purine position of C5 (5-Lys-Sp). Considering that, reduction of the quinonoid intermediate and consequent formation of 8-oxodGuo instead of dSp could be a mechanism that avoids the generation 5-Lys-Sp. Thus, addition of GSH would have an important role in the DNA-protein crosslink prevention.

The glutathione content was also evaluated in all samples, since



**Fig. 5.** Effect of GSH and GSSG on 8-oxodGuo oxidation by 5 mM DHPNO<sub>2</sub>. Incubation and detection as described in Materials and Methods, Sections 2 and 3. All solutions were prepared in deuterated water. Results presented as media  $\pm$  standard deviation from 2 independent experiments in triplicate. Average concentration of 8-oxodGuo considered as 100% is  $0.31 \pm 0.02$  mM and of dSp is  $0.05 \pm 0.004$  mM (\*\*\*). Values statistically different from control with  $p < 0.001$ . (###) Values statistically different between curves with  $p < 0.001$ .

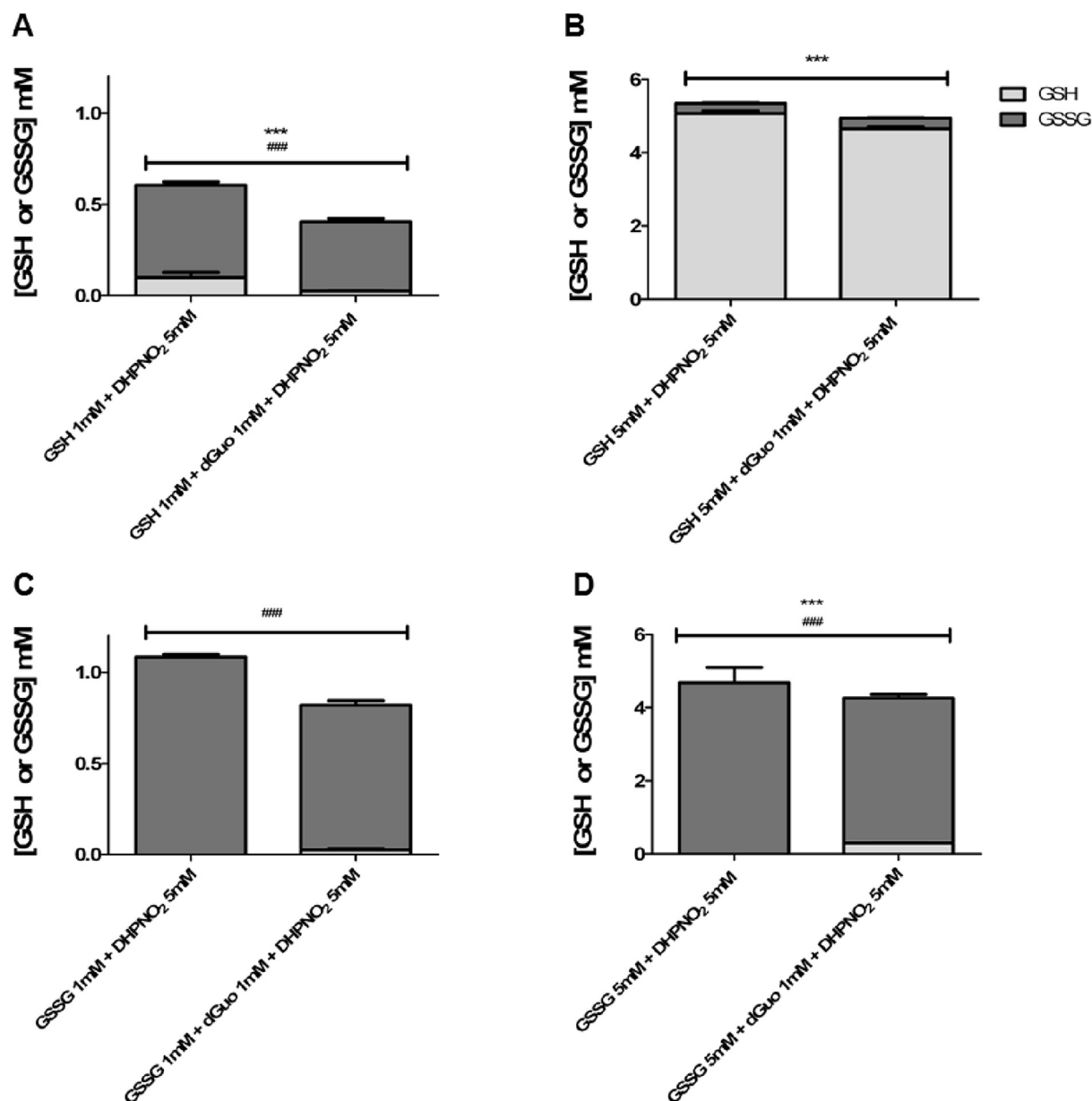
this information would be crucial to better understand the outcomes. Results are quite consistent with the amount of thiol added to the samples during the incubation. Control samples were performed with DHPN addition instead of DHPNO<sub>2</sub> which confirmed that DHPN has no effect under GSH oxidation or GSSG reduction. For example, incubations containing 5 mM GSH plus 5 mM DHPN showed a final GSH concentration of  $4.79 \pm 0.34$  mM and solutions containing 5 mM GSSG plus 5 mM DHPN showed a final GSSG concentration of  $4.62 \pm 0.27$  mM. Samples of 1 mM GSH plus DHPNO<sub>2</sub> after 2.5 h of incubation at 37 °C showed  $0.09 \pm 0.02$  mM of residual GSH and  $0.51 \pm 0.01$  mM of GSSG (Fig. 6A). This is consistent with the stoichiometry, since two molecules of GSH are necessary to form one molecule of GSSG. The same incubation was performed in the presence of 1 mM dGuo and in this case it was observed less GSSG ( $0.37 \pm 0.01$  mM) and almost no GSH (around 0.02 mM). The fact that it was detected less total thiol content (0.39 mM, which is the sum of GSH and GSSG content) in samples with dGuo is probably due to the formation of other GSH oxidation products, such as sulfenic, sulfinic and sulfonic acids [32]. However, in incubations with 5 mM GSH, only around 5% of the initial amount of GSH was converted to GSSG and there was little difference in the GSH content after dGuo addition (Fig. 6B). Comparing the last results with the 74% oxidation of GSH to GSSG when 1 mM dGuo was added to samples, it is perceived an influence of the amount of oxidant in the oxidation of the thiol in the presence of dGuo indicates that GSH is much more susceptible to oxidize itself to the GSSG form when there is overage of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> in solution.

When incubations were performed in the presence of 1 mM GSSG and 5 mM DHPNO<sub>2</sub>, no change in the glutathione content was observed (Fig. 6C). Interestingly, addition of 1 mM dGuo to these solutions promoted a decrease in the amount of GSSG to  $0.79 \pm 0.02$  mM. Similar results were observed in samples containing 5 mM GSSG, which means that 5 mM DHPNO<sub>2</sub> had no effect in the GSSG content, while addition of 1 mM dGuo also decreased the original amount of GSSG, this time to  $3.96 \pm 0.10$  mM (Fig. 6D). It is important to highlight that dGuo promoted the exact 79% decrement in the GSSG content in both cases. Also, it promoted some conversion to GSH: around 1.25% of the 1 mM GSSG was converted to GSH (0.025 mM) and 2.9% of the 5 mM GSSG was converted to GSH (0.29 mM). Upon reduction, one molecule of GSSG turns into two molecules of GSH. The species responsible for

GSSG reduction to GSH remains unknown but we believe that it could be one of the intermediates present in the mechanism of dGuo oxidation by <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

GSH and GSSG content was also measured in the samples incubated with 8-oxodGuo instead of dGuo. As it can be observed in Fig. 7A, 1 mM GSH oxidation by <sup>1</sup>O<sub>2</sub> was prevented by 8-oxodGuo, result that did not happen with dGuo (Fig. 6A). There was very little conversion to GSSG in samples containing 1 or 5 mM of GSH (Fig. 7A and B). Samples containing 8-oxodGuo and GSSG remained basically with the amount of thiol added in solution (Fig. 7C and D). As there was no thiol oxidation that justifies its consumption to chemically protect 8-oxodGuo oxidation to dSp, data infers that GSH and GSSG act by physical quenching, that means, these species consume <sup>1</sup>O<sub>2</sub> energy, converting it in O<sub>2</sub>. Other substances such as lycopene,  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol where found acting as <sup>1</sup>O<sub>2</sub> physical quenchers as well [33]. The fact that the <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quenching constant of 8-oxodGuo is higher than the one of GSH could also be contributing to the protection of GSH oxidation observed in Fig. 7A. That means that in solutions with 1 mM GSH and 1 mM 8-oxodGuo, 8-oxodGuo could be oxidized rather than GSH. As it was observed no dSp formation (Fig. 6A), routes for the other oxidation products would be favored. But, when the stoichiometry between GSH and 8-oxodGuo is altered to 5-fold thiol for each 8-oxodGuo molecule, this effect was no longer observed (Fig. 7B).

Altogether, these results of glutathione content may help to understand the results presented in Figs. 3 and 5. The more protective effect of GSSG in the oxidation of dGuo observed in Fig. 3D and consequent less generation of 8-oxodGuo (Fig. 3E) may be, at least, partially explained by the fact that there was little change in the glutathione content. Samples with GSH would have more chance to be oxidized by DHPNO<sub>2</sub> not only to GSSG, but also to other GSH oxidation products (sulfenic, sulfinic and sulfonic acids, as mentioned before), and these species could have an important role in the increased oxidation of dGuo. Also, it could indicate that GSSG in fact has no effect in changing the mechanism of oxidation of dGuo as addition of 1 mM GSSG maintained the regular pathway of oxidation of the nucleoside, thus meaning a higher dSp generation over 8-oxodGuo one (Fig. 3E and F). Then, the effect observed when it was added 5 mM of GSSG in solution would be provoked by the GSH originated from the GSSG reduction (Fig. 6D). Also, as reduction of GSSG was observed only in the presence of dGuo and



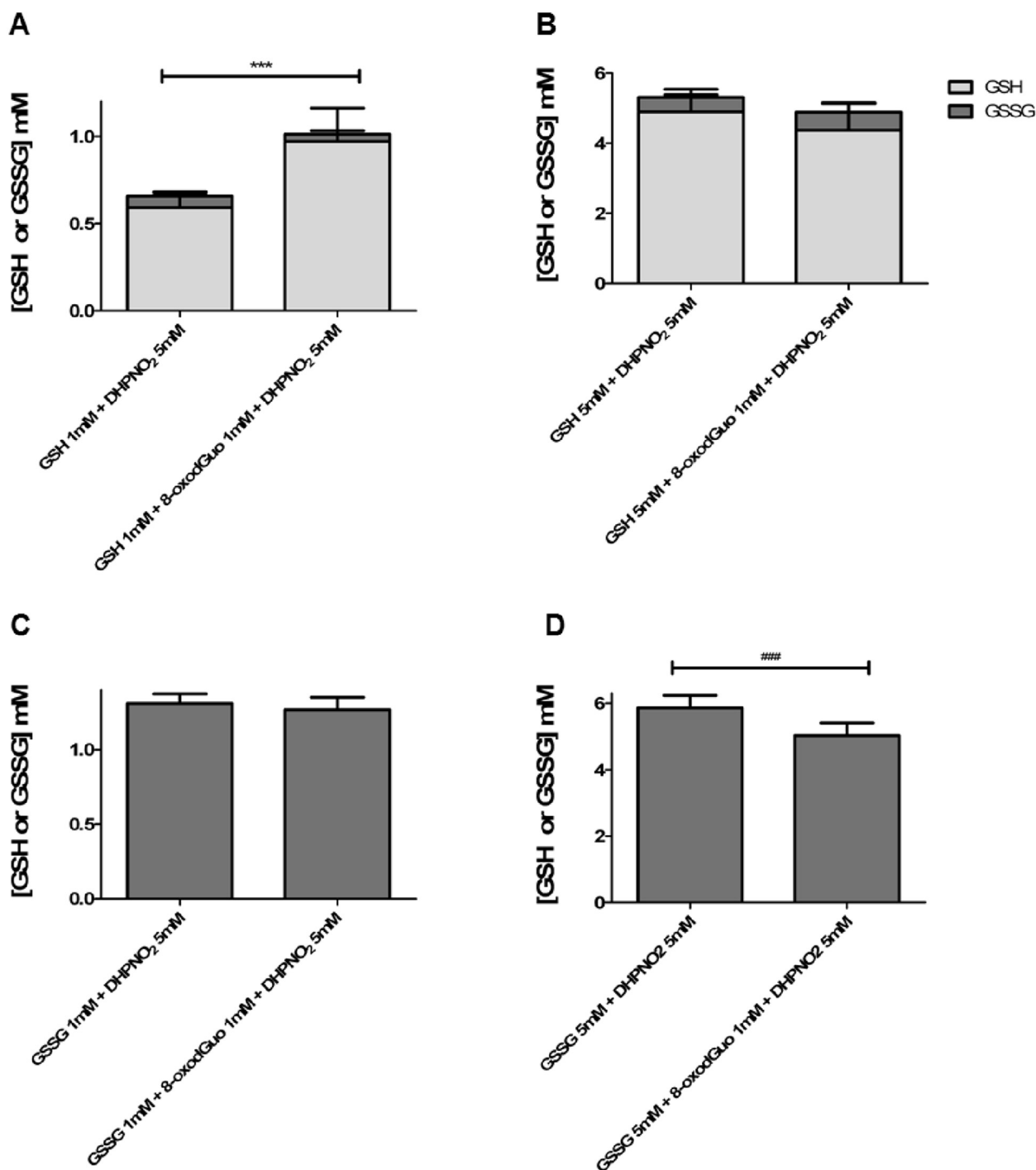
**Fig. 6.** Concentration of GSH and GSSG in solutions containing dGuo, DHPNO<sub>2</sub> and GSH or GSSG. Incubation and detection as described in Materials and Methods, Sections 2 and 4. Results presented as media  $\pm$  standard deviation from 2 independent experiments in triplicate. (\*\*\*)Values statistically different between the GSH content with  $p < 0.001$ . (###) Values statistically different between the GSSG content with  $p < 0.001$ .

DHPNO<sub>2</sub>, it may indicate that as <sup>1</sup>O<sub>2</sub> oxidizes dGuo, some reducing agent (oxidation product or intermediate species) may be formed and immediately act by reducing GSSG to GSH. Although it was observed only 0.29 mM of GSH generated from the 5 mM GSSG, it cannot be ruled out the possibility that it was formed even more GSH that was immediately reconverted to GSSG by <sup>1</sup>O<sub>2</sub> in solution. Furthermore, taking together results from Figs. 5 and 7, it can be stated that GSH is not acting in the step of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> oxidation of 8-oxodGuo to dSp. This statement is confirmed by the fact that, although dSp generation drops to zero by glutathione addition, there is no change in the GSH/GSSG content that justifies it. 1 mM GSH was converted to GSSG or to other products (Fig. 7A), but lesser than when incubation were performed with dGuo (Fig. 6A). Also, samples incubated with 8-oxodGuo and 1 mM GSSG had no change in the glutathione content (Fig. 7C and D), whereas samples incubated with dGuo showed GSSG consumption and reduction (Fig. 6C and D).

As showed before, consumed dGuo is not totally converted in 8-oxodGuo or dSp. Besides the possibility of generation of other oxidation products, such as imidazolone or oxazolone, it could also indicate formation of a glutathione conjugate. Ye et al. [34] showed in a mechanistic study that the dSp product was found to be formed from an H<sub>2</sub>O attack on the C5 position of the oxidized form of 8-oxodGuo. It is conceivable that a deprotonated glutathione (GS<sup>-</sup>) could act as a nucleophile and conjugate with the C5 position of the oxidized 8-oxodGuo, thereby giving rise to a new product (conjugate) that is distinct from 8-oxodG or dSp. Thus, the lack of formation of dSp could be attributed to a new and competing pathway (i.e., through conjugation with glutathione) that contributes to the depletion of the key intermediate that is required for the formation of dSp.

As Devasagayam et al. [19] showed that the generation of 8-oxodGuo by dGuo oxidation by <sup>1</sup>O<sub>2</sub> was pD dependent and it was annulled at pD 9, some experiments were also performed in D<sub>2</sub>O

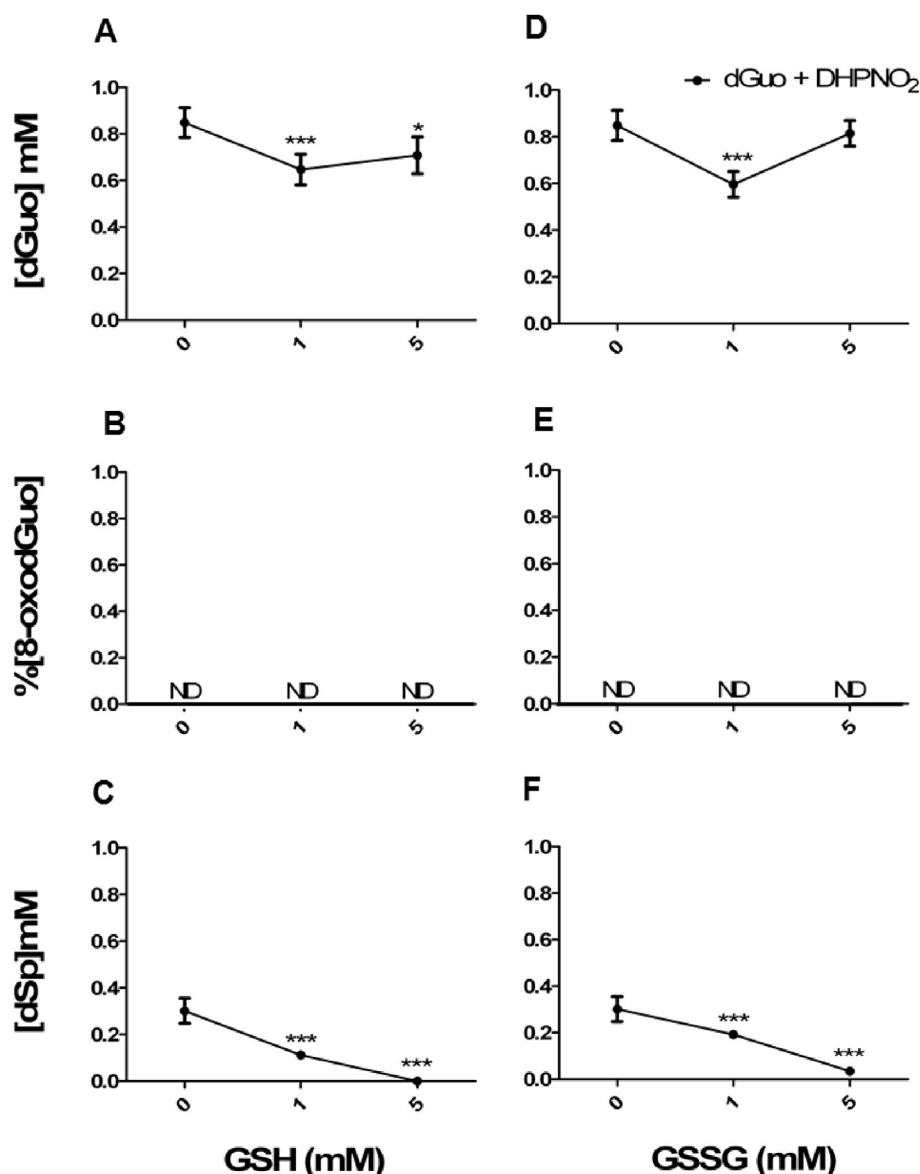




**Fig. 7.** Concentrations of GSH and GSSG in solutions containing 8-oxodGuo, DHPNO<sub>2</sub> and GSH or GSSG. Incubation and detection as described in Materials and Methods, Sections 2 and 4. All solutions were prepared in deuterated water. Results presented as media  $\pm$  standard deviation from 2 independent experiments in triplicate. (\*\*\*) Values statistically different between the GSH content with  $p < 0.001$ . (###) Values statistically different between the GSSG content with  $p < 0.001$ .

modified to reach pD 9. Under this condition, addition of GSH (Fig. 8A) or GSSG (Fig. 8D) did not protect the oxidation of dGuo as observed at pD 5.5 (Fig. 3A and D). Also, indeed, dGuo oxidation by 5 mM DHPNO<sub>2</sub> set 8-oxodGuo levels to zero and addition of GSH or GSSG to solutions did not change it. However, dSp basal levels (without glutathione addition) were around 50% higher at pD 9 than those observed in D<sub>2</sub>O pD 5.5 (Fig. 8). As much as glutathione decreased dSp levels and 5 mM GSH was capable of annulling it just

as observed in D<sub>2</sub>O solutions, 5 mM GSSG at pD 9 reduced dSp to  $0.03 \pm 0.00$  mM, without setting it to zero. Measurement of the glutathione content in solution performed at pD 9 showed, again, that when adding 1 mM GSH to solutions there is high a conversion to the GSSG form (Fig. 9A). Addition of 1 mM dGuo to samples containing 1 mM GSH and 5 mM DHPNO<sub>2</sub> promoted protection of  $0.23 \pm 0.03$  mM of the initial GSH in solution (Fig. 9A), but it does not reflect in 8-oxodGuo or dSp generation (Fig. 8B and C).



**Fig. 8.** Effect of GSH and GSSG on dGuo oxidation by 5 mM DHPNO<sub>2</sub> at pD 9. Incubation and detection as described in Materials and Methods, Sections 2 and 3. Results presented as media  $\pm$  standard deviation from 2 independent experiments in triplicate. (\*\*\*) Values statistically different from control with  $p < 0.001$  (\*) Values statistically different from control with  $p < 0.05$ . Control stands for incubation of 1 mM dGuo and 5 mM DHPNO<sub>2</sub>.

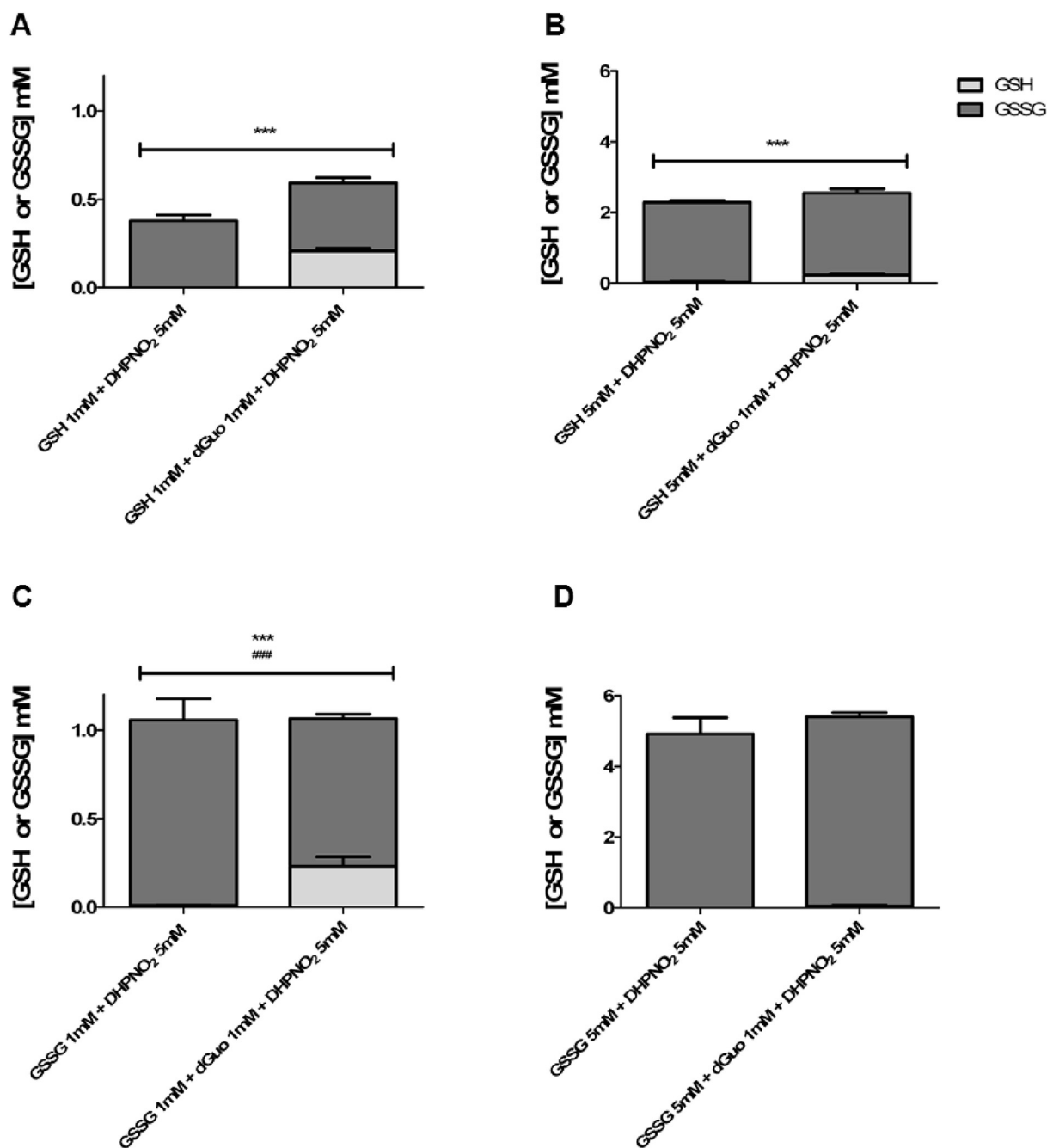
Experiments with 5 mM GSH also showed efficient conversion to GSSG ( $0.378 \pm 0.03$  mM), and although its concentration was lower than the 5 mM of GSH added to the solution, it is compatible with the fact that there is a need of two GSH molecules to form one molecule of GSSG (Fig. 9B). Samples containing 1 mM (Fig. 9C) or 5 mM (Fig. 9D) GSSG at pD 9 did not show great changes in the glutathione content. There was only a discrete consumption of the GSSG added to the solution of 1 mM dGuo plus DHPNO<sub>2</sub> and 5 mM GSSG (Fig. 9D). Curiously, under this condition it was found some residual dSp (Fig. 8F). It again indicates that GSSG protects dGuo oxidation more efficiently.

While glutathione added at pD 5.5 favors 8-oxodGuo generation, pD 9 clearly favors dSp formation. Thus, there is an important role of pD in the oxidation of dGuo. Alkali pDs could act by preventing the reduction of 8-OOHdGuo to 8-oxodGuo and favoring hydration to form dSp. Also, at pD 5.5, GSH does not tend to oxidize, unless in the presence of an oxidant agent, such as <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generated

from the DHPNO<sub>2</sub>. At pD 9, deprotonation of GSH is stimulated, so there is high concentrations of the thiolate anion in solution. Again, results indicate that thiolate anion could be conjugating with some key intermediate of dSp generation from dGuo and also with dGuo itself (GS-dGuo). That would explain why addition of glutathione would decrease dSp content at pD 9 as much as at pD 5.5 and why it was observed a reduction of dGuo levels in pD 9 (Fig. 8A and D) without generation of 8-oxodGuo or dSp.

#### 4. Conclusion

The reaction between GSH and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> or dGuo and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> is quite likely when we consider specific situations, as in the respiratory burst due to inflammatory states, or through solar ultraviolet energy. In the present work, we analyzed the role of glutathione, in its reduced and oxidized forms, in the oxidation of the free nucleoside dGuo by <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generated from the thermolysis of DHPNO<sub>2</sub>. We

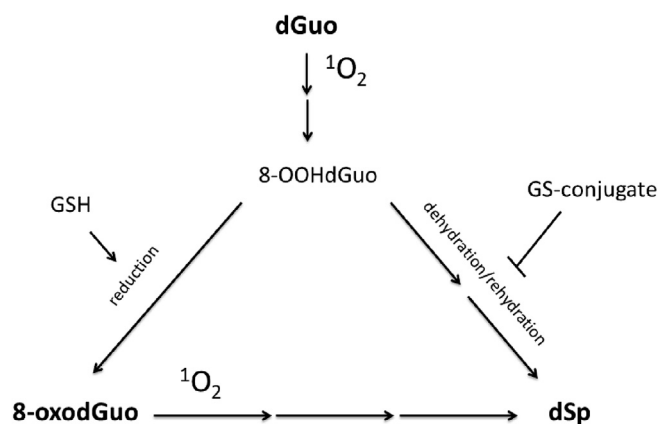


**Fig. 9.** Concentration of GSH and GSSG in solutions containing dGuo, DHPNO<sub>2</sub> and GSH or GSSG at pH 9. Incubation and detection as described in Materials and Methods, Sections 2 and 4. Results presented as media  $\pm$  standard deviation from 2 independent experiments in triplicate. (\*\*\*) Values statistically different between the GSH content with  $p < 0.001$ . (###) Values statistically different between the GSSG content with  $p < 0.001$ .

showed that the addition of GSH modifies dGuo oxidation by singlet oxygen by exalting the generation of 8-oxodGuo while diminishing dSp content. GSH could be acting favoring the reduction of the intermediate 8-OOHdGuo at the expense of the dehydration/rehydration reaction step at pH 5.5, but not at pH 9. Particularly in pH 9, the mechanism of oxidation of dGuo would also be altered by decreasing dSp to zero, but in this case formation of 8-oxodGuo was also prevented. Another explanation could be the formation of an intermediate-glutathione conjugate that would interfere in the reaction by decreasing a key intermediate that is required for the formation of Sp. All this possibilities are reported in

**Fig. 10.** The protective effect of GSH on the oxidation of 8-oxodGuo to dSp by  $^1\text{O}_2$  and the increase of 8-oxodGuo and decrease of dSp promoted by the addition GSH, but not by the addition of GSSG, may have serious biological consequences, because the accumulation of 8-oxodGuo increases the likelihood of this oxidation product to be inserted by DNA polymerase instead of dGuo. On the other hand, addition of GSH could act preventing the formation of DNA-protein cross-links. Considering our data and the pool of nucleotides, the role of GSH, which is generally regarded as beneficial in most redox processes, could also act by aggravating the adverse effect of singlet molecular oxygen.





**Fig. 10.** Effect of addition of GSH on the mechanism of oxidation of dGuo by  $^1\text{O}_2$ . Singlet oxygen oxidizes dGuo to 8-OOHdGuo that gives rise to 8-oxodGuo by reduction or dSp by dehydration/rehydration. 8-OxodGuo can be also oxidized by a second  $^1\text{O}_2$  molecule to dSp. GSH could favor 8-oxodGuo generation by reducing 8-OOHdGuo and also by forming a GS-conjugate that could disfavor 8-OOHdGuo dehydration/rehydration. GSH does not act directly in the pathway of dSp generation by 8-oxodGuo oxidation by singlet oxygen, but it acts as a  $^1\text{O}_2$  physical quencher that would leave less  $^1\text{O}_2$  available to oxidize 8-oxodGuo to dSp.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the Research Funding institutions, CNPq (Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico) Processos 482550/2012-0 and 311629/2013-0, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), INCT de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma Processo 573530/2008-4, PRPUSP (Pro-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo), NAP Redoxoma (PRPUSP; No. 2011.1.9352.1.8), CEPID Redoxoma (FAPESP; No. 2013/07937-8), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; No. 2012/12663-1) and John Simon Guggenheim Memorial Foundation (P.D.M. Fellowship). Authors gratefully thank PhD. Maria Eliane Merlin Rocha for her suggestions to this work and Lauro Mera de Souza (UFPR) and Fernanda Manso Prado (USP) for the technical assistance in MS/MS analysis.

## References

- [1] C.S. Foote, *Photochem. Photobiol.* 54 (1991) 659.

- [2] A.M. Held, D.J. Halko, J.K. Hurst, *Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 5732–5741.
- [3] P. Di Mascio, E.J.H. Bechara, M.H.G. Medeiros, K. Briviba, H. Sies, *FEBS Lett.* 355 (1994) 287–289.
- [4] C. Pierlot, J.-M. Aubry, K. Briviba, H. Sies, P.D. Mascio, H.S. Lester Packer, *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2000, pp. 3–20.
- [5] J.-L. Ravanat, P. Di Mascio, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 40601–40604.
- [6] J.C. Niles, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, *Org. Lett.* 3 (2001) 963–966.
- [7] C. Sheu, C.S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 10446–10447.
- [8] G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, J.L. Ravanat, J. Cadet, P.D. Mascio, *Biol. Chem.* 383 (2002) 607–617.
- [9] P.T. Henderson, J.C. Delaney, J.G. Muller, W.L. Neeley, S.R. Tannenbaum, C.J. Burrows, J.M. Essigman, *Biochem. J.* 42 (2003) 9257–9262.
- [10] S. Boiteux, E. Gajewski, J. Laval, M. Dizdaroğlu, *Biochemistry* 31 (1992) 106–110.
- [11] M. Shimizu, P. Gruz, H. Kamiya, C. Masutani, Y. Xu, Y. Usui, H. Sugiyama, H. Harashima, F. Hanaoka, T. Nohmi, *Biochemistry* 46 (2007) 5515–5522.
- [12] J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, S. Caillat, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P.D. Mascio, A. Favier, J. Cadet, *Biol. Chem.* 385 (2005) 17–20.
- [13] J. Cadet, J.R. Wagner, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a012559.
- [14] J.D. Hayes, D.J. Pulford, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30 (1995) 445–520.
- [15] N.H.P. Cnubben, I.M.C.M. Rietjens, H. Wortelboer, J. van Zanden, P.J. van Bladeren, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10 (2001) 141–152.
- [16] P.C. Huber, W.P. Almeida, Á.d. Fátima, *Quím. Nova* 31 (2008) 1170–1179.
- [17] H. Wefers, H. Sies, *Eur. J. Biochem.* 137 (1983) 29–36.
- [18] T.P.A. Devasagayam, A.R. Sundquist, P. Di Mascio, S. Kaiser, H. Sies, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 9 (1991) 105–116.
- [19] T.P.A. Devasagayam, S. Steenken, M.S.W. Obendorf, W.A. Schulz, H. Sies, *Biochemistry* 30 (1991) 6283–6289.
- [20] G.R. Martinez, J.-L. Ravanat, J. Cadet, S. Miyamoto, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 3056–3057.
- [21] H. Kasai, S. Nishimura, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 2137–2145.
- [22] M.K. Shigenaga, J.-W. Park, K.C. Cundy, C.J. Gimeno, B.N. Ames, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 521–530.
- [23] G.R. Martinez, J.-L. Ravanat, J. Cadet, M.H.G. de Medeiros, P. Di Mascio, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1326–1332.
- [24] J.-L. Ravanat, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.* 8 (1995) 379–388.
- [25] C.D. Carneiro, J.C. Amorim, S.M.S.C. Cadena, G.R. Noleto, P. Di Mascio, M.E.M. Rocha, G.R. Martinez, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 2380–2387.
- [26] J.P. Richie, L. Skowronski, P. Abraham, Y. Leutzinger, *Clin. Chem.* 42 (1996) 64–70.
- [27] P.S. Samiec, C. Drews-Botsch, E.W. Flagg, J.C. Kurtz, P. Sternberg Jr., R.L. Reed, D.P. Jones, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998) 699–704.
- [28] S. Raoul, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 1892–1898.
- [29] P. Di Mascio, M.E. Murphy, H. Sies, *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1991) 194S–200S.
- [30] J. Cadet, J.-L. Ravanat, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P.D. Mascio, *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 1219–1225.
- [31] X. Xu, J.G. Muller, Y. Ye, C.J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 703–709.
- [32] L. Men, Y. Wang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 23–30.
- [33] P. Di Mascio, S. Kaiser, H. Sies, *Arch. Biochem. Biophys.* 274 (1989) 532–538.
- [34] Y. Ye, J.G. Muller, W. Luo, C.L. Mayne, A.J. Shallop, R.A. Jones, C.J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 13926–13927.

## **ANEXO 3**

Licença de uso de material publicado com direitos autorais.

# QUÍMICA NOVA

*Revista da Sociedade Brasileira de Química*

IQUSP - Bloco 3 S., Caixa Postal 26.037, 05513-970 São Paulo – SP  
fone (011) 3032-2299 fax (011) 3814-3602 e-mail: quimicanova@sbq.org.br

---

## Permissão para reprodução de material

Em nome dos detentores dos direitos autorais, os Editores da revista Química Nova, publicada pela **SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA**, fornece a *Patrícia da Silva Peres* a permissão para reimpressão, publicação e reprodução do material indicado a seguir:

**Figuras 1 e 3** do artigo intitulado “*Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos*”, dos autores *Paula C. Huber, Wanda P. Almeida e Ângelo de Fátima*, publicado em *Química Nova*, volume 31, páginas 1170-1179, em 2008 e **Tabela 1** do artigo intitulado “*Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas*”, dos autores *Graziella E. Ronsein, Sayuri Miyamoto, Etelvino Bechara, Paolo Di Mascio e Glaucia R. Martinez*, publicado em *Química Nova*, volume 29, páginas 563-568, em 2006.

A permissão deve ser utilizada exclusivamente para a publicação a seguir:

*Tese de doutorado da solicitante, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Glaucia R. Martinez*

Adicionalmente, a permissão é válida apenas se for dado o devido crédito à revista, da maneira descrita a seguir:

Adaptado de *Quim. Nova* **2008**, 31, 1170, com permissão da Sociedade Brasileira de Química

Reproduzido de *Quim. Nova* **2006**, 29, 563, com permissão da Sociedade Brasileira de Química

São Paulo, 16 de fevereiro, 2016



Vera Lúcia Pardini  
Editora de Química Nova

**ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 04, 2016

---

This is a License Agreement between Patricia Peres ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Patricia Peres
Customer address	R. Guilherme Pugsley, 1674 Curitiba, Paraná 80620000
License number	3771340297076
License date	Dec 17, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Archives of Biochemistry and Biophysics
Licensed content title	Glutathione modifies the oxidation products of 2'-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen
Licensed content author	Patrícia S. Peres, Andressa Valerio, Silvia M.S.C. Cadena, Sheila M.B. Winnischofer, Alexandra C. Scalfo, Paolo Di Mascio, Glaucia R. Martinez
Licensed content date	15 November 2015
Licensed content volume number	586
Licensed content issue number	n/a
Number of pages	12
Start Page	33
End Page	44
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	Yes
Number of languages	10
Languages	Portuguese
Title of your thesis/dissertation	ALTERAÇÕES NAS PROPORÇÕES DAS LESÕES OXIDATIVAS DA GUANINA PELO OXIGÊNIO SINGLETE GERADAS NA PRESENÇA DE GLUTATIONA
Expected completion date	Feb 2016



RightsLink®

[Home](#)[Account Info](#)[Help](#)

Live Chat

ACS Publications  
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

**Title:** Determination of the Quenching Rate Constants of Singlet Oxygen by Derivatized Nucleosides in Nonaqueous Solution

**Author:** Ferran Prat, Chi-Chien Hou, Christopher S. Foote

**Publication:** Journal of the American Chemical Society

**Publisher:** American Chemical Society

**Date:** May 1, 1997

Copyright © 1997, American Chemical Society

Logged in as:

Patricia Peres

Account #:

3000983828

[LOGOUT](#)**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2016 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)

**ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 04, 2016

---

This is a License Agreement between Patricia Peres ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Patricia Peres
Customer address	R. Guilherme Pugsley, 1674 Curitiba, Paraná 80620000
License number	3771950369864
License date	Dec 18, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology
Licensed content title	Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage
Licensed content author	Eduardo Alves de Almeida, Afonso Celso Dias Bainy, Ana Paula de Melo Loureiro, Glaucia Regina Martinez, Sayuri Miyamoto, Janice Onuki, Lívea Fujita Barbosa, Camila Carrião Machado Garcia, Fernanda Manso Prado, Graziella Eliza Ronsein, Carlos Alexandre Sigolo et al.
Licensed content date	April 2007
Licensed content volume number	146
Licensed content issue number	4
Number of pages	13
Start Page	588
End Page	600
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes

**ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 04, 2016

This is a License Agreement between Patricia Peres ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Patricia Peres
Customer address	R. Guilherme Pugsley, 1674 Curitiba, Paraná 80620000
License number	3802220151090
License date	Feb 04, 2016
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Chemical Physics
Licensed content title	Spectroscopy and photophysics of flavin related compounds: Riboflavin and iso-(6,7)-riboflavin
Licensed content author	Ewa Sikorska, Igor Khmelinskii, Anna Komasa, Jacek Koput, Luis F.V. Ferreira, Jose R. Herance, Jose L. Bourdelande, Siân L. Williams, David R. Worrall, Małgorzata Insińska-Rak, Marek Sikorski
Licensed content date	18 July 2005
Licensed content volume number	314
Licensed content issue number	1-3
Number of pages	9
Start Page	239
End Page	247
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Title of your thesis/dissertation	ALTERAÇÕES NAS PROPORÇÕES DAS LESÕES OXIDATIVAS DA GUANINA PELO OXIGÊNIO SINGLETE GERADAS NA PRESENÇA DE GLUTATIONA



RightsLink®

Home

Account  
Info

Help



Live Chat



**Title:** Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells:

**Author:** M. Abul Kalam, Kazuhiro Haraguchi, Sushil Chandani, Edward L. Loechler, Maasaki Moriya, Marc M. Greenberg, Ashis K. Basu

**Publication:** Nucleic Acids Research

**Publisher:** Oxford University Press

Copyright © 2006, Oxford University Press

Logged in as:

Patricia Peres

Account #:

3000983828

LOGOUT

## Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Patricia Peres ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3802220714783
License date	Feb 04, 2016
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Nucleic Acids Research
Licensed content title	Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells:
Licensed content author	M. Abul Kalam, Kazuhiro Haraguchi, Sushil Chandani, Edward L. Loechler, Maasaki Moriya, Marc M. Greenberg, Ashis K. Basu
Licensed content date	None
Volume number	34
Issue number	8
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Academic/Educational institute
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Author of this OUP article	No
Order reference number	None
Title of your thesis / dissertation	ALTERAÇÕES NAS PROPORÇÕES DAS LESÕES OXIDATIVAS DA GUANINA PELO OXIGÊNIO SINGLETE GERADAS NA PRESENÇA DE GLUTATIONA
Expected completion date	Feb 2016
Estimated size(pages)	104
Publisher VAT ID	GB 125 5067 30
Total	0.00 USD

ORDER MORE...

CLOSE WINDOW

Copyright © 2016 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)





RightsLink®

[Home](#)[Account  
Info](#)[Help](#)

Live Chat

ACS Publications  
Most Trusted. Most Cited. Most Read.**Title:**Oxaluric Acid as the Major  
Product of Singlet Oxygen-  
Mediated Oxidation of 8-Oxo-  
7,8-dihydroguanine in DNA

Logged in as:

Patricia Peres

Account #:

3000983828

**Author:**Victor Duarte, Didier Gasparutto,  
Lydia F. Yamaguchi, et al[LOGOUT](#)**Publication:**Journal of the American  
Chemical Society**Publisher:**

American Chemical Society

**Date:**

Dec 1, 2000

Copyright © 2000, American Chemical Society

**PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE**

This type of permission/license, instead of the standard Terms & Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from (COMPLETE REFERENCE CITATION). Copyright (YEAR) American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any other uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested, permission must be obtained from that source.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2016 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)



RightsLink®

Home

Account  
Info

Help



WILEY

**Book:** Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**Chapter:** Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals**Author:** Marcelo Hermes-Lima**Publisher:** John Wiley and Sons**Date:** Jan 28, 2005

Copyright © 2004 Wiley-Liss, Inc. All rights reserved.

Logged in as:

Patricia Peres

Account #:  
3000983828

LOGOUT

**Order Completed**

Thank you for your order.

This Agreement between Patricia Peres ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

[Get the printable license.](#)

License Number	3802230172694
License date	Feb 04, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Wiley oBooks
Licensed Content Title	Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals
Licensed Content Author	Marcelo Hermes-Lima
Licensed Content Date	Jan 28, 2005
Licensed Content Pages	50
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	figure 12.11
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	ALTERAÇÕES NAS PROPORÇÕES DAS LESÕES OXIDATIVAS DA GUANINA PELO OXIGÊNIO SINGLETE GERADAS NA PRESENÇA DE GLUTATIONA
Expected completion date	Feb 2016
Expected size (number of pages)	104
Requestor Location	Patricia Peres R. Guilherme Pugsley, 1674  Curitiba, Brazil 80620000 Attn: Patricia Peres
Billing Type	Invoice
Billing address	Patricia Peres R. Guilherme Pugsley, 1674  Curitiba, Brazil 80620000 Attn: Patricia Peres
Total	0.00 USD

**CLOSE WINDOW**

Copyright © 2016 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)

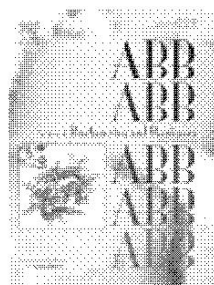


RightsLink®

Home

Account  
Info

Help



**Title:** Glutathione modifies the oxidation products of 2'-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen

**Author:** Patrícia S. Peres, Andressa Valerio, Silvia M.S.C. Cadena, Sheila M.B. Winnischofer, Alexsandra C. Scalfo, Paolo Di Mascio, Glaucia R. Martinez

**Publication:** Archives of Biochemistry and Biophysics

**Publisher:** Elsevier

**Date:** 15 November 2015

Copyright © 2015 Published by Elsevier Inc.

Logged in as:  
Patricia Peres  
Account #:  
3000983828

LOGOUT

## Order Completed

Thank you very much for your order.

This is a License Agreement between Patricia Peres ("You") and Elsevier ("Elsevier"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the [payment terms and conditions](#).

[Get the printable license.](#)

License Number	3802230704060
License date	Feb 04, 2016
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Archives of Biochemistry and Biophysics
Licensed content title	Glutathione modifies the oxidation products of 2'-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen
Licensed content author	Patrícia S. Peres, Andressa Valerio, Silvia M.S.C. Cadena, Sheila M.B. Winnischofer, Alexsandra C. Scalfo, Paolo Di Mascio, Glaucia R. Martinez
Licensed content date	15 November 2015
Licensed content volume number	586
Licensed content issue number	n/a
Number of pages	12
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	ALTERAÇÕES NAS PROPORÇÕES DAS LESÕES OXIDATIVAS DA GUANINA PELO OXIGÊNIO SINGLETE GERADAS NA PRESENÇA DE GLUTATIONA
Expected completion date	Feb 2016
Estimated size (number of pages)	104
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.00 USD / 0.00 GBP
Total	0.00 USD

ORDER MORE...

CLOSE WINDOW

Copyright © 2016 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)